

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Interacción de temperatura y Clorpirifos (PYRINEX ®)
sobre la estabilidad genética de *Poecilia reticulata*
“GUPI”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en
Hidrobiología y Pesquería

AUTOR

Fernando Jesús TAPIA VILCHEZ

ASESOR

Betty Elena SHIGA OSHIGE

Lima - Perú

2017



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

INTERACCION DE TEMPERATURA Y CLORPIRIFOS (PYRINEX ®)
SOBRE LA ESTABILIDAD GENETICA DE *Poecilia reticulata* "GUPI"

Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo
con mención en Hidrobiología y Pesquería

Bach. FERNANDO JESÚS TAPIA VILCHEZ

Asesora: Blga. BETTY ELENA SHIGA OSHIGE

Lima - Perú

2017

*“La única manera de continuar en vida es
manteniendo templada la cuerda de
nuestro espíritu, tenso el arco, apuntando
hacia el futuro”.*

- **Prosas Apátridas**
J.R. Ribeyro

Agradecimientos

La investigación es una actividad muy compleja, más compleja de que lo que, como principiante, hubiera creído en el momento en que ideé este trabajo de tesis el cual es producto del esfuerzo conjunto mío y de todas las personas que han estado involucradas en su realización y que de forma directa o indirecta han puesto un granito de arena (o varios sacos) para su realización finalmente satisfactoria.

En ese sentido, debo en primer lugar, agradecer a mis papás quienes además de haberme dado educación de calidad, son a quienes atribuyo que este trabajo se presente ahora y no dentro de unos años. A mis abuelas Ernestina y Yolanda a quienes les hubiera encantado este momento, a mi tía Miriam que de muchas formas contribuyó a mi crecimiento, a Debra quien siempre estuvo dándome ánimo y a mis hermanas Maribel y Jessica a quienes debería servir de ejemplo (espero no fallarles).

En segundo lugar, agradezco especialmente a mi asesora Blga. Betty Shiga quien siempre estuvo pendiente, no sólo de este trabajo si no de varios más, y cuyos comentarios siempre son de lo más valiosos y acertados, igualmente al profesor Blgo. José Pino quien, además de ser revisor de esta tesis, también estuvo presente desde mis primeros pasos como biólogo, y a mis revisores Mg. Iris Samanez y Blgo. Max Hidalgo por sus acertadas sugerencias.

En tercer lugar, a la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en donde todo comienza y donde se gestó este trabajo, a mis amigos y compañeros del laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo por mencionar algunos: Marie, Antuané, Pamela, Leonardo, Kevin y muchos más, de quienes he recibido ayuda, consejos y mucho ánimo.

Finalmente, te agradezco a ti lector, que con tu lectura haces que tanto esfuerzo haya valido la pena, espero con toda sinceridad que lo que encuentres aquí sea te sea útil.

Índice General

RESUMEN.....	V
ABSTRACT.....	VI
I INTRODUCCIÓN.....	1
II MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 CLORPIRIFOS	3
2.2 GENOTOXICIDAD: ENSAYO DE MICRONÚCLEOS.....	6
2.3 <i>POECILIA RETICULATA</i> PETERS (1859) “GUPÍ”	8
2.4 TEMPERATURA Y METABOLISMO.....	10
2.5 ECOTOXICOLOGÍA EN UN AMBIENTE MULTIFACTORIAL.....	13
III HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	16
3.1 HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	16
3.2 OBJETIVO GENERAL	16
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
IV MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
4.1 MATERIALES	17
4.1.1 <i>Material Biológico</i>	17
4.1.2 <i>Equipos y Aparatos</i>	18
4.1.3 <i>Reactivos</i>	18
4.2 METODOLOGÍA	19
4.2.1 <i>Aclimatación de individuos</i>	19
4.2.2 <i>Bioensayos</i>	19
4.2.3 <i>Ensayo de micronúcleos</i>	20
4.2.4 <i>Análisis y procesamiento de datos</i>	21
V RESULTADOS.....	24
5.1 HOMOGENEIDAD DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	24
5.2 CONDICIONES DE LA PRUEBA.....	26
5.3 MORTALIDAD DE <i>POECILIA RETICULATA</i>	27
5.4 ANORMALIDADES NUCLEARES Y MICRONÚCLEOS	29
5.5 INTERACCIONES DE TEMPERATURA Y CONCENTRACIÓN DE CLORPIRIFOS	32
VI DISCUSIÓN.....	35
VII CONCLUSIONES	45
VIII RECOMENDACIONES	46
IX REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
ANEXOS	61
ANEXO 1 REGISTRO FOTOGRÁFICO	62
ANEXO 2 FIGURAS.....	66
ANEXO 3 TABLAS.....	68

Índice de Fotografías

Fotografía 1: Anormalidades nucleares de células del epitelio branquial de <i>P. reticulata</i> . Aumento de 100 X	30
Fotografía 2: Lugar de colecta Centro de Investigación Acuícola de Calango (UCSUR).....	63
Fotografía 3: Acuario de cuarentena y aclimatación de <i>P. reticulata</i>	63
Fotografía 4: Stock de Pyrinex ® de 480 g/L de ingrediente activo Clorpirifos.....	64
Fotografía 5: Acuarios de tratamientos de Clorpirifos x Temperatura.....	64
Fotografía 6: Individuos machos de <i>P. reticulata</i> medidos y pesados.....	65

Índice de Figuras

Figura 1: Diagrama de cajas - Longitud Total de <i>Poecilia reticulata</i> según tratamientos.....	24
Figura 2: Diagrama de cajas - Longitud Estándar de <i>Poecilia reticulata</i> según tratamientos.....	25
Figura 3: Diagrama de cajas - Pesos de <i>Poecilia reticulata</i> según tratamientos	25
Figura 4: Diagrama de cajas – registros de temperatura de acuarios de tratamientos de Clorpirifos x temperatura.....	26
Figura 5: Registro acumulado de individuos muertos de <i>P. reticulata</i> a 17°C según la concentración de Clorpirifos.....	28
Figura 6: Curva de mortalidad de <i>P. reticulata</i> a 17°C	28
Figura 7: Diagrama NMDS de anormalidades nucleares frente a la concentración de Clorpirifos y la temperatura.....	33
Figura 8: Diagramas de interacción de los factores concentración de Clorpirifos vs Temperatura según las anormalidades nucleares.....	34
Figura 9: Estructura química 2D del Clorpirifos.....	67
Figura 10: Diagrama de Shepard de residuos reales vs. ajustados del diagrama NDMS.....	67

Índice de Tablas

Tabla 1: Frecuencias (%) de anormalidades nucleares por tratamiento (temperatura x concentración de Clorpirifos	31
Tabla 2: Resultados del análisis principal del modelo PERMANOVA.....	32
Tabla 3: Volumen de solución de stock de Clorpirifos por tratamiento.....	69
Tabla 4: Estadísticos descriptivos para individuos de <i>Poecilia reticulata</i>	69
Tabla 5: Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett – Temperatura de ensayo	69
Tabla 6: Prueba de normalidad de Shapiro – Wilk – Temperatura de ensayo	69
Tabla 7: Prueba de Kruskal – Wallis – Temperatura de ensayo	69
Tabla 8: Registro de parámetros de calidad de agua del acuario de aclimatación.....	70
Tabla 9: Registro de parámetros de calidad de agua de los acuarios de tratamientos.....	71
Tabla 10: Resultados del análisis de comparaciones por pares mediante PERMANOVA de Temperatura según la Concentración de Clorpirifos.....	72
Tabla 11: Resultados del análisis de comparaciones por pares mediante PERMANOVA de Concentración de Clorpirifos según la Temperatura.....	73

Glosario

Acetilcolinesterasa (AChE): una enzima activa en las hendiduras de la sinapsis neuromuscular, la cual canaliza la ruptura de acetilcolina, el neurotransmisor más común de la unión neuromuscular. Muchos insecticidas afectan la función de la acetilcolinesterasa.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

Bioacumulación: describe cómo un químico es asimilado por los organismos.

Biodisponibilidad: indica qué tan bien un compuesto puede ser asimilado por los organismos.

Clorpirifos: insecticida y acaricida organofosforado usado para el control de plagas a nivel del follaje y suelo en una variedad de cultivos alimenticios, su mecanismo de acción se basa en inhibir la acetilcolinesterasa.

Ecotoxicología: el objetivo de esta disciplina es entender los efectos de los tóxicos en las comunidades biológicas de los ecosistemas.

Efecto sub-letal: un efecto observado que ocurre sin la muerte del organismo.

Especie centinela: organismo indicador usado en biomonitoreo para evaluar los efectos de los contaminantes.

Evaluación de riesgo: en toxicología acuática, evaluar el riesgo causado por la contaminación para los organismos estudiados.

Ensayo cometa: un método comúnmente usado para indicar la presencia de agentes genotóxicos que han causado rupturas de hebras de ADN. El nombre “ensayo cometa” viene de la aparición de la aparición de una “cola” de ADN sin daño formada por electroforesis la cual permite estimar diferentes aspectos de daño al ADN.

Especies Reactivas del Oxígeno (EROs): especies del oxígeno con electrones desapareados o capas de electrones accesibles.

Estrés: cualquier cambio en ambiente biótico o abiótico del organismo que causa reacciones específicas en el mismo.

Estrés oxidativo: Una perturbación del balance redox en la dirección de oxidación. El estrés está asociado con un incremento en la formación especies reactivas del oxígeno.

Genotoxicidad: toxicidad que aparece en el material genético.

LC₅₀: concentración letal para el 50% de organismos. El valor es altamente dependiente del tiempo de exposición, el cual necesita ser dado.

Logit: inverso de la función logística sigmoideal, ocasionalmente usado para analizar datos a partir de la evaluación de toxicidad.

Micronúcleo: Fragmento o cromosoma completo que por no poseer huso mitótico no puede ser integrado al núcleo, por lo que queda en el citoplasma celular.

Mutágeno: un compuesto que causa un incremento en la tasa de mutación

Organismo objetivo: la especie o grupo de especies (p. ej. Insectos) hacia los cuales la acción tóxica de un químico está dirigida.

Prueba de toxicidad estática: prueba de toxicidad en la cual es medio y organismos son puestos en a prueba y no son reemplazados durante la misma.

PERMANOVA (Permutational analysis of variance): prueba estadística multivariada no-paramétrica, es utilizada para comparar grupos de objetos y evaluar la hipótesis nula que los centroides o dispersión de los grupos son equivalentes para todos los grupos.

Sinergismo: donde diferentes químicos fortalecen las acciones de otros.

Tóxico: un químico el cual tiene efectos adversos en la función de los organismos puede ser natural o hecho por el hombre.

USEPA (US Environmental Protection Agency): Institución del gobierno de los Estados Unidos que vela por los asuntos ambientales.

Xenobiótico: un compuesto extraño en el ambiente.

Resumen

Clorpirifos (Pyrinex ®) es un insecticida organofosforado de amplio uso en la agricultura, la extensión de su uso en el Perú no está documentada, sin embargo, se estima que podría ser parte de una variedad de tóxicos presentes en el agua y que tendrían efectos deletéreos sobre poblaciones locales de peces. Interacciones de la temperatura (17, 25 y 30 °C) fueron evaluadas, en presencia de concentraciones sub-letales de Clorpirifos (0, 0.005, 0.010, 0.015, 0.020 y 0.025 mg/L) enfocadas en estabilidad genética expresada en términos de frecuencia de micronúcleos y otras anormalidades nucleares sobre *Poecilia reticulata* “gupi”. Los resultados muestran que las interacciones fueron significativas ($p = 0.001$), la frecuencia de anormalidades nucleares no difiere entre grupos control independientemente de la temperatura, se observaron incrementos significativos con la concentración ($p = 0.001$) y la temperatura ($p = 0.001$), al mismo tiempo se reportó una CL_{50} para Clorpirifos a 17°C de 0.015 mg/L, no se reportó mortalidad a 25 y 30°C. Se sugiere que la toxicidad varía en sus mecanismos de acción según las interacciones: (1) a temperaturas altas (25 y 30°C) la genotoxicidad se incrementa, sin mortalidad; y (2) a temperaturas bajas (17°C), se reducen los procesos de formación de anormalidades nucleares, sin embargo, la mortalidad se ve aumentada significativamente debido a que Clorpirifos reduce umbral de tolerancia de temperatura de *P. reticulata*. Se confirma el alto riesgo de Clorpirifos y sus interacciones con la temperatura, por lo que se sugiere que los ensayos de ecotoxicidad deben tomar en consideración la temperatura del ambiente y no sólo la temperatura óptima de la especie en evaluación lo cual conllevaría a una sub- o sobre estimación de la toxicidad. Estas interacciones de contaminantes y medio ambiente (en especial la temperatura) deben ser considerados en el contexto de eventos climáticos extremos, cambio climático y de cambios en la actividad agrícola e industrial.

Palabras clave: Clorpirifos, temperatura, genotoxicidad, *Poecilia reticulata*, interacción.

Abstract

Chlorpyrifos (Pyrinex ®) is an organophosphorus insecticide widely used in agriculture, the extent of its use in Peru is not documented, however, it is estimated that it could be part of a variety of toxicants present in the water and that would have deleterious effects on local fish populations. Temperature interactions (17, 25 and 30°C) were evaluated in the presence of sub-lethal concentrations of Chlorpyrifos (0, 0.005, 0.010, 0.015, 0.020 y 0.025 mg/L) focused on frequency of micronuclei and other nuclear abnormalities on *Poecilia reticulata* “gupi”. The results show that interactions were significant ($p = 0.001$), the frequency of nuclear abnormalities did not differ between control groups regardless of temperature, significant increases were observed with concentration ($p = 0.001$) and temperature ($p = 0.001$), at the same time was reported an LC₅₀ for Chlorpyrifos at 17°C of 0.015 mg/L, no mortality was reported at 25 and 30°C. It is suggested that toxicity varies in its mechanisms of action according to interactions: (1) at high temperatures (25 and 30°C) genotoxicity increases, without mortality; and (2) at low temperatures (17°C) the processes of formation of nuclear abnormalities are reduced, however, mortality is significantly increased because Chlorpyrifos reduces the temperature tolerance threshold of *P. reticulata*. The high risk of Chlorpyrifos and their interactions with temperature is confirmed, so it is suggested that the ecotoxicity tests must take into consideration the temperature of the environment and not only the optimal temperature of the species under evaluation which would lead to a sub- or over estimation of toxicity. These interactions of pollutants and environment (especially temperature) should be considered in the context of extreme weather events, climate change and changes in agricultural and industrial activity.

Keywords: Chlorpyrifos, temperature, genotoxicity, *Poecilia reticulata*, interaction.

I Introducción

Clorpirifos es un insecticida y acaricida organofosforado usado para el control de plagas a nivel del follaje y suelo en una variedad de cultivos alimenticios, su mecanismo de acción se basa en inhibir la acetilcolinesterasa, dando lugar a: 1) la sobreestimulación de células neuronales, 2) neurotoxicidad y 3) muerte. Los mecanismos sobre organismos que no son el objetivo de Clorpirifos; tales como peces, mamíferos y el ser humano son similares. Sin embargo, la evaluación del riesgo ecológico de Clorpirifos y otros pesticidas organofosforados sobre poblaciones salvajes especialmente en ecosistemas de agua dulce más allá de los efectos más evidentes ha sido poco estudiada.

Considerando que en el ambiente interactúan un número indefinido de factores, estas interacciones entre los organismos, los contaminantes y su medio físico crean múltiples escenarios de efectos adversos sobre el desempeño de poblaciones naturales. El Perú posee una amplia diversidad de ecosistemas acuáticos, los cuales varían considerablemente en hábitat morfológico, temperatura, dureza, salinidad, oxígeno disuelto y otras variables fisicoquímicas; asimismo posee una gran diversidad biológica la cual está expuesta a estrés constante producido por la introducción accidental o voluntaria de agentes contaminantes relacionados directamente con actividades antropogénicas, tales como la agricultura, efluentes domésticos, industriales y pesca ilegal.

Específicamente la temperatura, tiene efectos directos sobre el metabolismo, pudiendo afectar de este modo el modo en que Clorpirifos interactúa con los organismos (Chapman, 2016). Conceptos tales como el de aclimatación y adaptación fijan los límites en los cuales los organismos son capaces de responder a cambios drásticos en la temperatura, es más los efectos de temperaturas fuera de los límites óptimos para el desempeño de una especie

tendrían efectos aditivos frente al estrés generado por factores externos tales como los contaminantes (Beitinger & Bennett, 2000).

Por otro lado, *Poecilia reticulata*, “Gupi”, es una especie íctica exótica, en Perú, común en sistemas de aguas continentales, razón por la cual, el presente trabajo evalúa su utilización como centinela, en el contexto de su abundancia, facilidad de colecta y manejo, en orden de mejorar el entendimiento de la interacción Clorpirifos - Temperatura - *P. reticulata*.

Entre todos los posibles efectos de las concentraciones sub-letales en poblaciones silvestres aquellos que reflejan efectos sobre el ADN son bien conocidos, el ensayo de micronúcleos puede proveer información del daño genético causado en poblaciones silvestres, que pueden tener efectos negativos en su rendimiento reproductivo y calidad genética de futuras generaciones. Consecuentemente, es necesario demostrar que la temperatura influiría sobre las interacciones de concentraciones sub-letales de Clorpirifos con el daño genotóxico sobre *P. reticulata*, generando información que mejoraría el desempeño de modelos de evaluación de contaminación de aguas por pesticidas organofosforados, así como la interpretación de diversos resultados concernientes a ensayos estándares de ecotoxicología los cuales emplean parámetros constantes (temperatura, salinidad, oxígeno, etc.) en la evaluación de factores de estrés químico, adicionalmente el estudio de las relaciones de contaminantes y temperatura fijan los primeros pasos en la interpretación de los posibles efectos negativos que el cambio climático podría tener sobre los ecosistemas.

II Marco Teórico

2.1 Clorpirifos

Koshlukova & Reed (2014), describen el perfil químico del Clorpirifos como sigue:

- Número de registro del servicio de resúmenes químicos: CAS 2921-88-2
- Nombre químico: *O,O-dietil O-3,5,6-trichloropyridin-2-Il fosforotioato*.
- Sinónimos: Brodan, Detmol UA, Dowco 179, Dursban, Epire, Eradex, Lorsban, Pageant, Pridano, Scout, Stipend.
- Clase química: Organofosfato, Insecticida, Acaricida, Nematocida.
- Estructura química: Ver Figura 9 del Anexo 2.
- Fórmula molecular: $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$
- Peso molecular: $350.59 \text{ g mol}^{-1}$
- Densidad: 1.51 g cm^{-3} a 21°C
- Presión de vapor: 0.00002 mmHg (0.003 Pa) a 25°C
- Punto de ebullición: $> 320^\circ\text{C}$
- Punto de fusión: $41-42^\circ\text{C}$
- Punto de inflamación: $>200^\circ\text{F}$
- Factor de conversión: $1 \text{ ppm} = 14.31 \text{ mg m}^{-3}$ a 25°C
- Apariencia: De color blanco, cristalino sólido.
- Olor: Mercaptano leve

El mecanismo clásico de toxicidad de Clorpirifos está relacionado a su habilidad de unirse e inhibir la Acetilcolinesterasa (AChE). El sistema nervioso es el primer objetivo porque las AChE hidrolizan el neurotransmisor acetilcolina y por tanto finaliza la acción sináptica. La inhibición de la AChE incrementa la disponibilidad de acetilcolina en la sinapsis neural llevando a una excesiva estimulación de las rutas colinérgicas en el sistema nervioso central y periférico. Una inactivación significativa de la AChE causa efectos colinérgicos, morbilidad o muerte (ATSDR, 1997).

Los pesticidas organofosforados son conocidos por producir estrés oxidativo, y la formación de radicales libres del oxígeno pueden influir de manera significativa la toxicidad (Bagchi, et al., 2002). De los radicales libres, el radical hidroxilo (OH) es altamente reactivo y causa daño al DNA y otras moléculas biológicas, este daño está implicado en procesos de mutagénesis (Dizdaroglu, et al., 2002). En peces, la respuesta positiva del estrés oxidativo producido por Clorpirifos ha sido demostrada (Xing, et al., 2012), así como su actividad genotóxica (Ali, et al., 2008, Bhatnagar, et al., 2016). Estudios han demostrado la actividad genotóxica de Clorpirifos mediante el test de micronúcleos en *Cirrhinus mrigala* (Bhatnagar, et al., 2016) y *Channa punctatus* (Ali, et al., 2008)

La mayoría de pesticidas organofosforados, como Clorpirifos, son lipofílicos e interactúan con los organismos vivos a través de sus membranas lipídicas, a su vez son menos persistentes en el ambiente y sistemas vivos que los organoclorados (Antunes-Madeira & Madeira, 1979). Recientemente, se ha incrementado el interés en tales compuestos de baja persistencia, y los potenciales efectos adversos sobre especies que no son el objetivo del pesticida que su administración casual en el ecosistema conlleva (Laetz, et al., 2015). Barron & Woodburn (1995), evalúan el riesgo ecológico de la administración de Clorpirifos en ecosistemas acuáticos, cuya medida típica de riesgo está basada en el cálculo de la letalidad (CL₅₀ y DL₅₀).

Según USEPA (2002-a), Clorpirifos es uno de los pesticidas organofosforados más ampliamente usados a nivel mundial. Durante 1987-98 alrededor de 20 millones de libras fueron usadas en los Estados Unidos. Alrededor del 60% del total es usado en cultivos de maíz, árboles de nueces, frutas y granos de soya; y hasta el 2001 fue usado en hogares de los Estados Unidos para el control de termitas, cucarachas y pulgas. Hoy en día, su uso fuera de la agricultura está limitado al control del mosquito con fines de salud pública, sin embargo, este continúa siendo usado en grandes cantidades para el control de plagas en

los cultivos en todo el mundo. En países en desarrollo, el uso excesivo y la falta de equipos de protección resultan en cientos de miles de muertes anualmente (Koshlukova & Reed, 2014).

Considerando que la mayoría de insecticidas son organofosforados usados para el control de insectos en cultivos, productos de hogar, productos almacenados, y para tratar infecciones parasitarias externas de peces cultivados, ganado y animales domésticos (Lushchak, 2011); y además que Clorpirifos es uno de los organofosforados agroquímicos más vendidos que han sido detectados ampliamente en cuerpos de agua superficiales y la prohibición de los organofosforados más tóxicos su uso se ha incrementado rápidamente (Bhatnagar, et al., 2016) y cuya presencia se ha reportado en aguas subterráneas de todo el mundo, por ejemplo, en Portugal se reporta entre 0.01 y 1.95 µg/L (Palma, et al., 2010). La pérdida de pesticidas desde el suelo ambiental se da a través de volatilización, asimilación por plantas, escorrentía a ríos, lixiviación al agua subterránea, y degradación microbiana y abiótica, el agua superficial es el principal receptor de contaminación por pesticidas a partir de la agricultura a través de escorrentía en drenajes o pequeños arroyos (Bloomfield, et al., 2006). Además, Bollmohr, et al. (2007) examinaron la exposición y toxicidad de una variedad de pesticidas, incluyendo Clorpirifos, en artrópodos y peces del río Lourens y un estuario en Western Cape, Sudáfrica, aunque no se detectaron cantidades significativas de pesticidas en la zona alta del río, estos fueron encontrados en las partes bajas y en el estuario en niveles que probablemente significarían riesgo agudo y crónico para la vida acuática. Por lo tanto, no es posible descartar el ingreso de Clorpirifos en cantidades ecológicamente importantes en los ecosistemas de agua dulce en el Perú.

Según la lista de plaguicidas agrícolas con registro vigente en SENASA (2013); en el Perú Clorpirifos es comercializado con alrededor de 36 nombres comerciales entre los que destacan Clorfos 1.5, Lorsban 4E, Pyrinex ® y Tifon 4F, entre otros. Además, la legislación

peruana vigente establece los Estándares de Calidad Ambiental para Agua para los plaguicidas organofosforados Malatión, Metamidofós, Paraquat y Paratión, la lista no incluye a Clorpirifos entre los plaguicidas regulados en el ámbito ambiental por el estado (MINAM, 2008). Asimismo, no se han hallado registros de la extensión del uso de Clorpirifos en el Perú, ni de su llegada a los cuerpos de agua a través de la agricultura. Sin embargo, según IMARPE (2007) se reporta el uso de pesticidas como método de pesca ilegal, aunque no se especifica el tipo de pesticida, dada la falta de regulación, facilidad de compra y alta toxicidad en el agua, Clorpirifos podría ser uno de los pesticidas utilizados en esta actividad.

2.2 Genotoxicidad: Ensayo de Micronúcleos

Agentes físicos y químicos pueden dañar el DNA de las células de los organismos presentes en los cuerpos de agua, estas lesiones pueden iniciar una cascada de consecuencias biológicas a nivel celular, sistémico, individual, poblacional y comunitario (Lee & Steinert, 2003). La inducción de cambios en la expresión del genoma en la biota natural puede ser estudiada a través de alteraciones cromosomales tales como aberraciones, rupturas de DNA, crossing-over, etc. (Vasseur, et. al., 2013).

El test de micronúcleos, es un ensayo *in vivo* o *in vitro* para la detección de daño genético causado por factores de estrés a través de la presencia de micronúcleos en el citoplasma de células en interfase (Mavournin, et al., 1990, Galloway, et al., 2011). Un micronúcleo viene de fragmentos cromosomales que no están incluidos en el núcleo luego de la división celular y su frecuencia depende de la tasa de ruptura y/o pérdida cromosomal y de la tasa de división celular (Heddle, et. al., 1984). La medida de micronúcleos es más fácil y rápida de aplicar que otros métodos citogenéticos, debido al número elevado de cromosomas de la mayoría de peces, a su vez las células objetivo son células en interfase de tejidos en proliferación independientemente de su cariotipo, esta característica le da ventaja para el monitoreo ambiental (Vasseur, 1995).

Hoy en día el test de micronúcleos es uno de los bioensayos más usados para la evaluación de la genotoxicidad en invertebrados y peces, y en la actualidad se aplica en una variedad de organismos acuáticos incluyendo anfibios, erizos, bivalvos, crustáceos y anélidos (Bolognesi & Hayashi, 2011). En peces, el ensayo de micronúcleos ha sido ampliamente validado en diversas especies para evaluar la exposición a una variedad de factores de estrés químicos como metales pesados (Al-Sabti, et al., 1994, Nepomuceno, et al., 1997, Castaño, et al., 1998, Barbosa, et al., 2010), pesticidas (Farah, et al., 2003, Cavas & Serpil, 2007, Campana, et al., 1999, Ateeq, et al., 2002), petróleo y sus derivados (Al-Sabti, 2000, Hoshina, et al., 2008); y físicos como radiación (Schultz, et al., 1993) y shock térmico (Anitha, et al., 2000).

Usualmente el sacrificio de los individuos de prueba es requerido para la obtención de muestras para estudios citológicos (Arkhipchuk & Garanko, 2005); entre los tipos celulares usualmente requeridos están los eritrocitos de sangre periférica (Hooftman & de Raat, 1982), las células epiteliales de aletas (Arkhipchuk & Garanko, 2005) y branquias (Arslan, et al., 2015), las cuales están directamente expuestas a los contaminantes ambientales. Hayashi, et al. (1998), recomiendan el uso de células epiteliales de branquias para el ensayo de micronúcleos, por las altas frecuencias de micronúcleos reportadas respecto a los reportados en eritrocitos de sangre periférica para las mismas poblaciones, y el consecuente poder estadístico que esto conlleva.

Por otro lado, las anomalías nucleares tales como los núcleos lobulados, células binucleadas, núcleos arriñonados y con estrangulaciones, son consideradas como consecuencias de la exposición de contaminantes químicos con actividades citotóxicas, genotóxicas y mutagénicas en el ambiente (Lajmanovich, et al., 2014). Aunque los mecanismos responsables de la formación de estas anomalías no han sido totalmente explicados, estas son consideradas como indicadores de daño genotóxico y por lo tanto

son un complemento del ensayo de micronúcleos en ensayos de rutina de evaluación de la genotoxicidad (Gökalp & Güner, 2011).

2.3 *Poecilia reticulata* Peters (1859) “Gupi”

Los miembros del Orden Cyprinodontiformes son peces cosmopolitas que habitan latitudes tropicales y templadas; son especialmente notables en una variedad de hábitats de aguas dulces y salinas (Rosen & Bailey, 1963). Actualmente el orden está dividido en diez familias; de estas, tres: Poeciliidae, Anablepidae y Godeidae, son endémicas de Sudamérica (Van der Laan, et al., 2014).

La Familia Poeciliidae está conformada por peces pequeños los cuales no superan los 200 mm de longitud total, y la mayoría alcanzan menos de la mitad de ese tamaño, ellos conforman uno de los grupos dominantes en aguas dulces y salobres de Centro y Sudamérica. Esta familia incluye algunos de los peces más pequeños y polimórficos; asimismo, es inusual en los peces debido a que la mayoría de las estructuras taxonómicamente importantes están concentradas en el macho, estos muestran importantes contrastes entre especies, mientras que, las hembras muestran comparativamente pocos (Rosen & Bailey, 1963).

Poecilia reticulata, como todos los miembros de la familia Poeciliidae, tiene un claro dimorfismo sexual. Los machos miden entre 25-35 mm de longitud estándar (LE) y poseen patrones polimórficos de color conspicuos consistiendo en combinaciones de negro, blanco, rojo-naranja, amarillo, verde, manchas, líneas y puntos iridiscentes. Los machos tienen un gonopodio; una aleta anal modificada usada como órgano intromitente, así como la aleta anal de las hembras es redondeada. Las hembras son de un color gris plateado uniforme, y son más grandes (40-60 mm LE). Los juveniles se asemejan a la hembra, y son independientes a partir del nacimiento (CABI, 2016).

Según Meffe & Snelson (1989), los peces de la familia Poeciliidae viven en una variedad de hábitats ocupando zonas templadas y tropicales, hay dos razones principales para su amplia distribución: (1) son excelentes colonizadores; y (2) alta tolerancia térmica y a la salinidad; resultando en la habilidad de mantener poblaciones en hábitats sub-óptimos. Con relación a su tolerancia termal *P. reticulata* posee un umbral superior de temperatura alrededor de los 32 °C, y la temperatura óptima fluctúa entre 20 y 30 °C, dependiendo de la temperatura de aclimatación, en la cual la intensidad de la exhibición de comportamiento reproductivo es más alta (Meffe & Snelson, 1989).

P. reticulata es una de las 20 especies introducidas identificadas en sistemas de aguas continentales en el Perú y las más común en los ríos de la vertiente del Pacífico; fue introducida durante la década de 1940 para controlar los insectos vectores de la malaria, esta especie reside en la mayoría de ambientes naturales a lo largo de la costa norte y centro, y en la selva alta y baja, e incluso en aguas contaminadas (Ortega, et al., 2007).

Según Berthet (2013), en orden de reflejar la intensidad de la exposición a contaminantes, e integrar los efectos de varios parámetros que actúan en el ambiente, define una serie de características que deben ser consideradas de gran importancia para lograr interpretaciones adecuadas, y entre las más importantes se pueden citar: (1) Su sedentarismo en el sitio de estudio, (2) su fácil identificación, captura y colecta a lo largo del año, (3) suficiente tamaño poblacional que resista cualquier impacto producido por colectas regulares, (4) un amplio y conocido rango de distribución geográfica y de tipos de hábitat, (5) longevidad de varios años y resistencia a los contaminantes del ambiente permitiendo a los organismos estar expuestos a los contaminantes durante periodos prolongados, (6) relaciones dosis-efecto y causa-efecto deben estar consistentemente establecido, y (7) la biología de la especie tiene que estar suficiente mente bien conocida

para diferenciar las señales entre el ruido estadístico de factores que pueden influir el resultado.

Considerando los párrafos anteriores, *Poecilia reticulata* reúne la mayoría de los requisitos para poder ser considerada como una especie centinela (incluyendo una amplia y conocida distribución en el Perú (Ortega, et al., 2007)), exceptuando el punto cinco relacionado con la longevidad, así el gupi ha sido ampliamente usado para evaluar respuesta frente a diversos contaminantes tales como metales pesados (Miliou, et al., 1998, Wester & Canton, 1992), disruptores endocrinos (Georgescu, et al., 2013, Baatrup & Junge, 2001), pesticidas (Viran, et al., 2003, Polat, et al., 2002, Yilmaz, et al., 2004, Keizer, et al., 1991), y una gran variedad de otras sustancias (Hermens & Leeuwangh, 1982).

2.4 Temperatura y Metabolismo

Según Chang & Overby (2011), la temperatura se define como el promedio de la energía cinética asociada con el movimiento aleatorio de átomos y moléculas, así un grupo de moléculas de rápido movimiento tendrá mayor energía cinética, y por lo tanto mayor temperatura que otro grupo de moléculas con movimiento lento de la misma masa. Por otro lado, la energía térmica es la energía total de un sistema y no depende enteramente de la energía cinética, sino también del volumen y la masa; mientras que, calor es la transferencia de energía térmica entre dos cuerpos que están a diferentes temperaturas.

Cuando la temperatura de un sistema se incrementa a su vez lo hace la energía térmica del mismo sistema, lo que ocasiona un alza en la tasa de la mayoría de reacciones químicas (Hill, et al., 2012). Los enlaces moleculares débiles (que incluyen puentes de hidrógeno, enlaces iónicos, interacciones de Van der Waals, e interacciones hidrofóbicas); juegan un papel importante en la determinación de la estructura de moléculas como proteínas y ácidos nucleicos, y su comportamiento en membranas biológicas (Bettelheim, et al., 2013). En general incrementos de temperatura tienden a desestabilizar, estos enlaces moleculares

débiles en proteínas al punto de desnaturalizarlas y volverlas no funcionales, así como bajas temperaturas vuelven a las proteínas demasiado rígidas para un funcionamiento efectivo (Somero, 1995).

Los efectos de la temperatura en organismos vivos son tan marcados que han desarrollado múltiples estrategias para compensar estos efectos de la temperatura, estas estrategias pueden ser distinguidas en base a la constancia de la temperatura corporal de los organismos (homeotermos y poiquilotermos) y a la fuente de calor que afecta la temperatura corporal (endotermos y ectotermos), la mayoría de aves y mamíferos son homeotérmicos endotermos ya que mantienen una temperatura corporal relativamente constante como resultado de la generación de calor metabólico, mientras que la mayoría de peces son poiquilotermos ectotermos cuya temperatura interna varía como resultado de cambios en la temperatura del ambiente (Cossins & Bowler, 1987). Aunque los ectotermos generan calor como resultado de sus procesos metabólicos, estos no generan suficiente calor interno para balancear la pérdida de calor con el ambiente, en peces el calor es rápidamente perdido a través de la sangre que circula por las branquias y entra en contacto directo con el agua (Beitinger & Lutterschmidt, 2011).

La temperatura es un parámetro particularmente importante en peces ya que estos son ectotérmicos y, por lo tanto, establece los límites en los cuales un pez puede vivir; en particular los peces que pueden vivir en un amplio rango de temperaturas son llamados euritermos, mientras que los peces que están especializados a vivir en un rango de temperatura estrecho son llamados estenotermos (Beitinger & Bennett, 2000). La sensibilidad térmica de un pez puede resumirse en una “curva de rendimiento”, la cual relaciona algunos parámetros de tolerancia como la letalidad o el mantenimiento de la homeostasis o el rendimiento como la fecundidad, el crecimiento o la tasa metabólica con la temperatura; estas curvas proporcionan información tal como la temperatura óptima de

rendimiento, la “ventana termal”, y las temperaturas máximas y mínimas toleradas para la supervivencia (Cossins & Bowler, 1987).

En general, mucho calor o muy poco puede matar a los organismos, de hecho, la temperatura puede actuar como un agente letal, la letalidad puede producirse por la coagulación de proteínas a altas temperaturas o la formación de cristales de hielo a bajas temperaturas, sin embargo, la letalidad generalmente ocurre antes de estos eventos (Beitinger & Lutterschmidt, 2011). La temperatura ambiental influye en la tasa de los procesos fisiológicos de los peces, el rango de temperaturas que una especie puede tolerar es un componente importante de su nicho n -dimensional y es la base para entender los patrones de distribución de las especies (Magnuson & de Stasio, 1997)

Uno de los efectos más severos de las temperaturas ambientales extremas es la mortalidad (Beitinger & Bennett, 2000). Por otro lado, la aclimatación es una respuesta adaptativa que intenta restaurar la homeostasis, o al menos reducir la probabilidad de letalidad ajustando los límites de tolerancia termal como una respuesta frente a ambientes variables (Angilletta, 2009). La capacidad de aclimatación es altamente variable entre especies, esta involucra cambios bioquímicos y fisiológicos, incluso dentro de una misma especie hay diferencias en la tasa fisiológica en la aclimatación (Reynolds & Casterlin, 1979). Dado que la aclimatación involucra más que la sola exposición de un organismo a una temperatura estable, la exposición a altas temperaturas ambientales logra una mayor tolerancia al calor y una menor al frío, en contraste la exposición a temperaturas bajas logra el efecto contrario (Beitinger & Bennett, 2000). Bennett, et al. (1998) demostraron que la direccionalidad de la aclimatación (de calor a frío o frío a calor), así como la extensión del cambio de temperatura y la especificidad de la tolerancia termal de la especie en cuestión influyen el tiempo requerido para la aclimatación, hallando que la tolerancia al calor es obtenida hasta tres veces más rápido que la tolerancia al frío.

La estacionalidad, tiene numerosos efectos sobre la tolerancia termal de las especies, la variabilidad experimentada de la temperatura y la disponibilidad de luz con máximos en verano y mínimos en invierno, influyen la tolerancia termal debido a la aclimatación (Sunday, et al., 2011). De este modo, los organismos influenciados por variaciones en la temperatura ambiental por estacionalidad u otras fuentes de variación, tales como variaciones diarias, ingreso de efluentes y otros; crean termociclos o termoperiodos los cuales pueden influenciar la tolerancia termal, estos ciclos deberían ser considerados para lograr simular mejor las condiciones ambientales en bioensayos (Jobling, 1997)

2.5 Ecotoxicología en un ambiente multifactorial

La ecotoxicología, es una disciplina relativamente nueva dedicada a la evaluación de los contaminantes y su efecto en el medio ambiente, para ello hace uso de múltiples disciplinas, entre las que destacan la biología, química, la toxicología y la ecología. Aunque el rol de la química ambiental está bien definido, la toxicología y ecotoxicología son hasta cierto punto contradictorias, mientras la primera evalúa los efectos de los químicos a nivel individual, el objetivo principal de la segunda es evaluar su impacto a nivel ecológico más que individual (Segner, 2007). En sus inicios la ecotoxicología dedicó esfuerzos a relacionar el medio químico directamente con la salud humana, este enfoque antropocéntrico de la ecotoxicología ha ido evolucionando en el tiempo centrando cada vez más su atención en temas cada vez más ecológicos (Walker, et al., 2012).

Las pruebas de ecotoxicidad estandarizadas son usadas para exponer organismos de prueba a un medio (agua, sedimento o suelo) y evaluar los efectos de la contaminación en la supervivencia, crecimiento, reproducción, comportamiento y otros atributos de estos organismos, estas pruebas buscan demostrar que los contaminantes están biodisponibles, estas pruebas hacen uso de metodologías estándar cuyos procedimientos incluyen guías para la elección de organismos centinelas, biomarcadores, medios, objetivos y pruebas

estadísticas (USEPA, 1994). La eficacia de estas pruebas de toxicidad para la protección a largo plazo de los ecosistemas permanece en debate, es difícil identificar cuantos problemas ambientales han sido ignorados debido a la aplicación de métodos convencionales, cuyas metodologías y conceptos de ecotoxicología tienen menos de “eco-” y se dedican más a la toxicología que a la ecología, el reto permanece en mejorar esta situación y encontrar conceptos y herramientas que lo hagan más práctico e informativo en orden de hacer la ecotoxicología más cercana a la ecología (Segner, 2007).

El medio ambiente no está libre de contaminantes químicos y otros estresores, son raros los casos en los que los organismos están sujetos a un solo factor de estrés, las combinaciones e interacciones entre contaminantes y las características químicas, físicas y biológicas del medio pueden ser evaluadas y predichas (van Straalen, 2003). La exposición a un estresor puede cambiar significativamente la respuesta frente a un segundo estresor, la aclimatación y las exposiciones crónicas a bajas dosis pueden ser de particular relevancia en la modulación de los efectos combinados de los químicos sobre los organismos presentes en el medio; sin embargo debe considerarse que cada especie ha pasado por un proceso evolutivo frente a ambientes cambiantes y múltiples impactos, así genéticamente algunas especies o poblaciones habrían desarrollado adaptaciones fisiológicas las cuales les permitirían responder mejor a condiciones desfavorables, las mismas que dificultarían la evaluación de efectos combinados (Laetz, et al., 2015). Van Straalen (2003) sugiere que frente a un ambiente multifactorial es necesario considerar que organismos, poblaciones y comunidades están expuestas a una variedad de estresores de forma integrada y no de manera aislada, y que la ecotoxicología debería volverse parte de un enfoque más amplio dentro de la ecología del estrés.

Las interacciones entre factores de estrés se han identificado en múltiples estudios que pueden modificar la sensibilidad a los contaminantes tales como el estado nutricional

(Braunbeck & Segner, 1992, Lanno, et al., 1989) y enfermedades (Odum, 1985, Snieszko, 1974). Respecto a la temperatura, se han desarrollado estudios que relacionan la tolerancia térmica y la influencia de la temperatura en pruebas de ecotoxicidad que evalúan los efectos de contaminantes (Olsvik, et al., 2016, Patra, et al., 2007). La pobre calidad del hábitat y los contaminantes influyen en la salud fisiológica, reduciendo la tolerancia termal, la mayoría de químicos evaluados producen reducciones significantes de la tolerancia termal, así la pobre calidad ambiental y la consecuente reducción del estado de salud de peces los hace más susceptibles a infecciones, enfermedades e incrementa el parasitismo (Beitinger & Lutterschmidt, 2011).

III Hipótesis y Objetivos

3.1 Hipótesis de investigación

Las interacciones de la temperatura y dosis sub-letales de Clorpirifos (0.005 mg/L, 0.01 mg/L, 0.015 mg/L, 0.020 mg/L y 0.025 mg/L de Pyrinex - 48®) influyen en la estabilidad genética de células branquiales de *Poecilia reticulata* en un ensayo de toxicidad aguda (96 horas).

3.2 Objetivo General

Determinar la influencia de las interacciones de temperatura (17, 25 y 30°C) y concentraciones sub-letales del Clorpirifos (0.005 mg/L, 0.01 mg/L, 0.015 mg/L, 0.020 mg/L y 0.025 mg/L de Pyrinex-48®¹) en la estabilidad genética de *Poecilia reticulata*, mediante un ensayo de toxicidad aguda.

3.3 Objetivos Específicos

- Evaluar la tasa de micronúcleos y anormalidades nucleares en células branquiales de *Poecilia reticulata* con cinco dosis sub-letales de Clorpirifos evaluados en un gradiente de temperatura para cada tratamiento y control.
- Determinar si hay diferencias en la frecuencia de micronúcleos y alteraciones nucleares entre tratamientos y el grupo control.
- Determinar si hay interacciones significativas entre la temperatura y las concentraciones de sub-letales de Clorpirifos.

¹ Insecticida de amplio espectro cuyo ingrediente activo es el Clorpirifos, en concentración de 480 g/L.

IV Material y Métodos

4.1 Materiales

4.1.1 Material Biológico

Para un total de 18 tratamientos, se seleccionaron 180 individuos machos de *Poecilia reticulata*, Cyprinodontiformes, Poeciliidae de 2 - 2.5 cm de longitud total aproximadamente, no se han considerado individuos hembras para reducir posibles covariables introducidas por sus características intrínsecas, tales como el estado reproductivo en el momento del ensayo, el dimorfismo sexual secundario marcado en la especie y posibles variaciones en su resistencia frente a contaminantes respecto a los machos (CABI, 2016), dado que el objetivo del presente proyecto es poner en evidencia las interacciones entre la temperatura y el Clorpirifos en la genotoxicidad producida.

Los individuos fueron colectados en el Centro de Investigación Acuícola de Calango de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas de la Universidad Científica del Sur (UCSUR)² (ver Fotografía 2, Anexo 1), los peces colectados inmediatamente fueron trasladados en bolsas plásticas saturadas de aire a las instalaciones del laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo, Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM.

Los peces fueron mantenidos en cuarentena durante 30 días en un acuario de 130 Litros, a temperatura ambiente (23 ± 1 °C), pH neutro (7.5), agua libre de cloro, 14 horas de luz artificial y 10 horas de oscuridad, y alimento comercial para peces de acuario pequeños (Aquafin 35% de proteína) (ver Fotografía 3 en el Anexo 1) hasta el inicio de los bioensayos.

² Cabe señalar que los peces no son criados en el centro si no que ingresan al mismo a través de los canales que abastecen los estanques del centro desde el río Mala.

4.1.2 Equipos y Aparatos

- 01 Agitador magnético
- 01 Aire acondicionado *Electrolux* Tipo SPLIT 1800 BTU/h
- 01 Balanza electrónica (0.01 g)
- 01 Computadora
- Materiales de vidrio variados
- 01 Micropipeta (25 - 100 μ L)
- 01 Microscopio estereoscópico
- 01 Microscopio Leica® con cámara integrada
- 01 Multiparámetro portátil marca Hanna ® 9300
- 18 Peceras de polipropileno libres de Bisfenol A (BPA) de 10 L
- 01 Termostato para acuario de 300 Watts
- 06 Termostatos para acuario de 50 Watts

4.1.3 Reactivos

- 50 mL de Aceite de inmersión
- 100 mL de Ácido acético glacial
- 180 L de Agua destilada desionizada
- 100 g de Bicarbonato de sodio
- 100 g de Cloruro de potasio
- 500 mL de Declorador para acuarios Aquaplust®
- 100 g de Detergente neutro
- 100 mL de Entellan®
- 100 mL de Giemsa SIGMA - ALDRICH
- 01 Kit Sera® aqua-test box (pH, dureza, nitratos, nitritos, fosfatos, amonio, amoniaco, cloruros y hierro)
- 01 L de Metanol absoluto
- 01 L de Pyrinex® (Clorpirifos 480 g/L)
- 200 mg de Sulfato de calcio dihidratado
- 100 mg de Sulfato de magnesio

4.2 Metodología

4.2.1 Aclimatación de individuos

Luego del periodo de cuarentena, y antes de cada bioensayo los individuos pasaron por periodo de aclimatación de 15 días a la temperatura de ensayo (17, 25 o 30 °C), antes del inicio de cada bioensayo en orden de evitar falsos positivos/negativos producto del shock térmico inducido por un cambio drástico de temperatura en el agua (Beitinger & Lutterschmidt, 2011).

4.2.2 Bioensayos

Previamente los acuarios de polipropileno libres de BPA fueron acondicionados mediante el lavado con detergente neutro (Alconox®), abundante agua potable y enjuagada con agua destilada. Para los bioensayos se utilizó como medio para los peces agua sintética elaborada según (USEPA, 2002-b) a continuación, se describen los pasos la elaboración de 10 Litros de agua reconstituida, estándar sintética, moderadamente dura:

1. Colocar 9.5 L de agua destilada desionizada en un recipiente de plástico limpio.
2. Añadir 0.60 g de MgSO_4 , 0.96 g de NaHCO_3 , y 0.040 g KCl al recipiente.
3. Homogenizar la mezcla.
4. Añadir 0.60 g de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 0.5 L de agua destilada desionizada en un matraz de Erlenmeyer. Agitar en un agitador magnético hasta que el sulfato esté disuelto.
5. Añadir a los 9.5 L preparados en el paso 3, y mezclar bien.
6. Airear la solución combinada durante 24 horas antes del inicio del ensayo y estabilizar el medio.

A cada uno de los acuarios acondicionados se le agregó un volumen de solución stock de Clorpirifos (1 g/L) preparada a partir del concentrado comercial *Pyrinex*® en concentración base de 480 g/L de Clorpirifos (ver Fotografía 4, Anexo 1), hasta alcanzar la concentración

deseada (0 mg/L, 0.005 mg/L, 0.01 mg/L, 0.015 mg/L, 0.020 mg/L y 0.025 mg/L de Clorpirifos), los volúmenes se encuentran especificados en la Tabla 3 del Anexo 3. Las concentraciones están basadas en la concentración letal media (CL_{50}), 0.176 mg/L de Clorpirifos calculada por (Sharbidre et. al., 2011) para *Poecilia reticulata*.

Un total 10 individuos fueron colectados al azar y asignados aleatoriamente a uno de los seis acuarios con los tratamientos de Clorpirifos predeterminados (0 mg/L, 0.005 mg/L, 0.01 mg/L, 0.015 mg/L, 0.020 mg/L y 0.025 mg/L de Clorpirifos), la temperatura se mantuvo estable mediante la combinación de aire acondicionado y calentadores de acuario, se ensayaron en total tres temperaturas 17, 25 y 30°C, para un total de 18 ensayos con una duración de 96 horas, la temperatura se revisó cada dos horas (ver Fotografías 4 y 5, Anexo 1). Al finalizar los ensayos se tomaron muestras de agua para análisis de su calidad (NO_2 , NO_3 , PO_4 , Cl^- , Fe^{2+} , NH_3 , NH_4 , CO_3 , y dureza); los peces fueron mantenidos sin alimentación durante los ensayos para reducir los efectos negativos de la acumulación de desechos metabólicos. En los ensayos en los que se hallaron peces muertos estos fueron retirados inmediatamente y preservados mediante fijador de Carnoy (3 Metanol absoluto: 1 Ácido acético glacial), diariamente se repuso el volumen de agua evaporada de los acuarios con agua destilada y desionizada (Cavas, et al. 2005).

4.2.3 Ensayo de micronúcleos

Al finalizar los ensayos, los peces fueron retirados de los acuarios de tratamientos, y sacrificados por shock hipotérmico siendo colocados directamente en agua a 3°C (Matthews & Varga, 2012). A cada pez se le asignó un código para una rápida identificación y se registró su longitud total (LT), longitud estándar (LE) y peso total (PT), ver Fotografía 6 del Anexo 1, y el opérculo fue removido en orden de dejar los arcos branquiales al descubierto, los individuos completos fueron colocados en crioviales de 2 mL con fijador de Carnoy y fueron almacenados hasta el momento de la preparación de láminas.

El ensayo de micronúcleos se realizó según el procedimiento descrito por Cavas , et al. (2005), previamente a la preparación de láminas, los individuos fueron retirados de los crioviales y las branquias les fueron extraídas y transferidas a viales con ácido acético glacial al 20% para la maceración de tejido durante 15 minutos, luego se realizó un frotis de los arcos branquiales sobre una lámina portaobjetos y se dejó secar al aire, se realizaron tres réplicas (láminas) por cada individuo. Las láminas fueron teñidas en solución de Giemsa al 5% por 30 minutos. La calidad de la tinción de las láminas fue revisada al microscopio y luego fueron montadas con laminillas cubreobjetos de 22x40 mm y Entellan ®. Las lecturas de las láminas fueron realizadas con un microscopio de campo claro con un aumento de 100 X y aceite de inmersión, en total se contabilizaron 1500 células (500 por réplica), se registró la frecuencia de micronúcleos y de anormalidades nucleares respecto al total de células contabilizadas. La clasificación de los micronúcleos y anormalidades nucleares se realizó considerando la morfología de las lesiones nucleares según Carrasco, et al. (1990) la descripción detallada se encuentra en la sección de resultados.

4.2.4 Análisis y procesamiento de datos

En primer lugar, se evaluó la homogeneidad de la población de estudio la cual se considera un requisito previo para validar la representatividad de las pruebas posteriores. En orden de demostrar que las características de los individuos de prueba fueron uniformes entre los grupos estudiados se realizó el análisis exploratorio mediante diagramas de cajas de los registros de Longitud Total (LT), Longitud Estándar (LE) y Pesos (P) de los individuos de pruebas según los tratamientos de Concentración de Clorpirifos x Temperatura. R^2

Los resultados de los registros de parámetros de calidad de agua fueron comparados con los límites de toxicidad en peces de agua dulce reportados de pH, amoníaco y cloro según Alabaster (1982), y nitrito según Lewis & Morris (1986). En orden de demostrar que los

tratamientos de temperatura fueron los adecuados, los registros de temperatura fueron analizados gráficamente mediante diagramas de cajas para evaluar la presencia de valores extremos, se comprobaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Bartlett respectivamente, al rechazarse el supuesto de normalidad se optó por la prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis ($\alpha = 0.05$) para determinar si existen diferencias significativas entre los registros de temperatura.

Debido al registro importante de mortalidad en algunos tratamientos en la temperatura de 17°C se consideró pertinente el análisis de la mortalidad en los mismos. Se estimó el número de horas transcurridas entre el inicio del ensayo y la muerte de cada individuo, se calculó la frecuencia acumulada de individuos muertos por hora de ensayo y se expresó gráficamente a través de un diagrama de líneas por cada tratamiento, además se realizó el cálculo de la concentración letal media (CL₅₀) mediante la ejecución de un modelo lineal generalizado considerando una regresión logística y una distribución estadística binomial (individuos muertos – vivos) utilizando las proporciones calculadas de individuos muertos en cada tratamiento con el fin de calcular la concentración de Clorpirifos en la cual la probabilidad de muerte (“éxito”) sea del 50%.

Al tratarse de un sistema multivariado que incluye dos factores en una estructura factorial de 3 x 6, se optó por el uso de un análisis de varianza multivariado permutacional PERMANOVA; (Anderson, 2001) para evaluar la interacción y diferencias entre los factores temperatura (3 niveles: 17, 25 y 30 °C) y concentración de Clorpirifos (6 niveles: 0, 0.005, 0.010, 0.015, 0.020 y 0.025 mg/L) sobre las variables (anormalidades nucleares) medidas en términos de frecuencias: Micronúcleo (MN), binucleados (BN), núcleo globular (GLB), núcleo lobulado (LOB), núcleo arriñonado (ARR), y núcleo vacuolado (VAC). Previamente al análisis los datos fueron transformados mediante una función *Logit* (Log_{x+1}) según las recomendaciones de Anderson (2005), primero se ejecutó un PERMANOVA de dos vías

para investigar las interacciones temperatura-concentración de Clorpirifos, una vez confirmada las interacciones (ver Resultados), luego se ejecutaron PERMANOVAs de una vía para determinar las diferencias entre los niveles de los factores temperatura y concentración de Clorpirifos. Todos los PERMANOVAs usaron sumas de cuadrados tipo III y distancias Euclidianas³ como medida de distancia entre muestras, tratando los factores temperatura y concentración de Clorpirifos como fijos, al mismo tiempo todos los análisis fueron determinados usando permutaciones sin restricciones de los datos transformados (999 permutaciones), el número de permutaciones fue suficiente por lo que no hubo la necesidad de usar p-valores generados por permutaciones de Monte Carlo⁴.

Se ejecutó un análisis de escalamiento no-métrico multidimensional (NMDS) utilizando distancias euclidianas como medida de distancia entre las muestras y los datos transformados logarítmicamente (Log_{x+1}) para visualizar los patrones multivariados, así como diagramas de interacción entre los factores para cada una de las variables analizadas.

Todos los análisis univariados; pruebas de Shapiro – Wilk, Bartlett y Kruskal – Wallis, así como, los diagramas de líneas, cajas, interacción y análisis nMDS fueron realizados mediante el software estadístico libre R (R Development Core Team, 2016) y el paquete gráfico Lattice (Deepayan, 2008). Los análisis de varianza multivariada permutacional fueron ejecutados usando el software PRIMER v6 con el complemento PERMANOVA + (Anderson, et al., 2008).

³ La distancia Euclidiana es la medida de la disimilitud multivariada entre dos muestras más usada en ecología. Cuanto mayor sea la distancia Euclidiana, mayor será la disimilitud entre muestras. (Anderson, et al., 2008)

⁴ Las permutaciones de Monte Carlo son un método de permutación alternativo incluido en el software PRIMER v6 con el complemento PERMANOVA +, el cual permite corregir el p-valor cuando el número de permutaciones no alcanza lo indicado debido a un número muestral muy pequeño. (Anderson, et al., 2008)

V Resultados

5.1 Homogeneidad de la población de estudio

Según indica la Figura 1, los registros de longitud total de los individuos de *P. reticulata* varían entre 1.90 y 2.50 cm, la mayoría de los registros se encuentran en 2.20 cm mientras el promedio es de 2.21 ± 0.12 cm, la Figura 2 muestra los registros de longitud estándar los cuales varían entre 1.40 y 2.00 cm la mayoría de registros son de 1.70 cm mientras el promedio es de 1.72 ± 0.09 cm, finalmente según la Figura 3 los registros de pesos de los individuos evaluados, al igual que los parámetros anteriores, no presentan grandes variaciones registrando sus valores en 0.08 y 0.13 g, con la mayoría de registros del valor 0.10 g y un promedio de 0.10 ± 0.01 g (ver Tabla 4, Anexo 3).

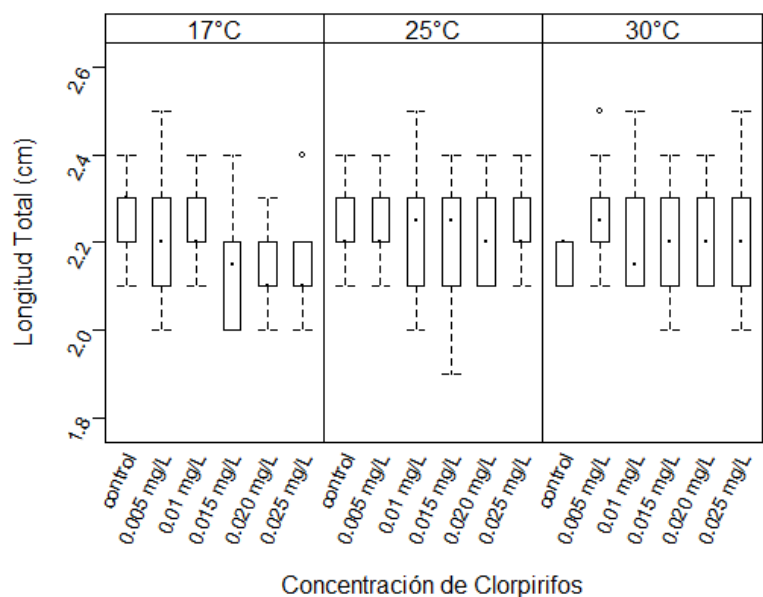


Figura 1: Diagrama de cajas - Longitud Total de *Poecilia reticulata* según tratamientos

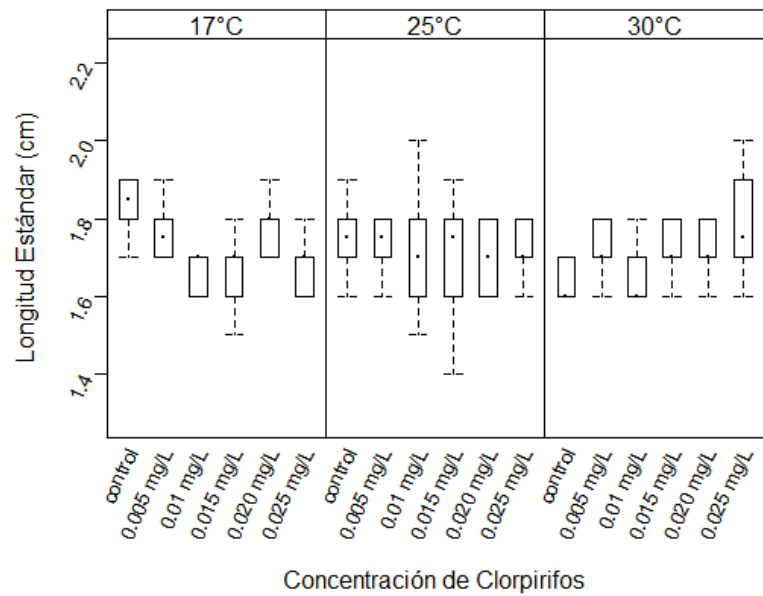


Figura 2: Diagrama de cajas - Longitud Estándar de *Poecilia reticulata* según tratamientos

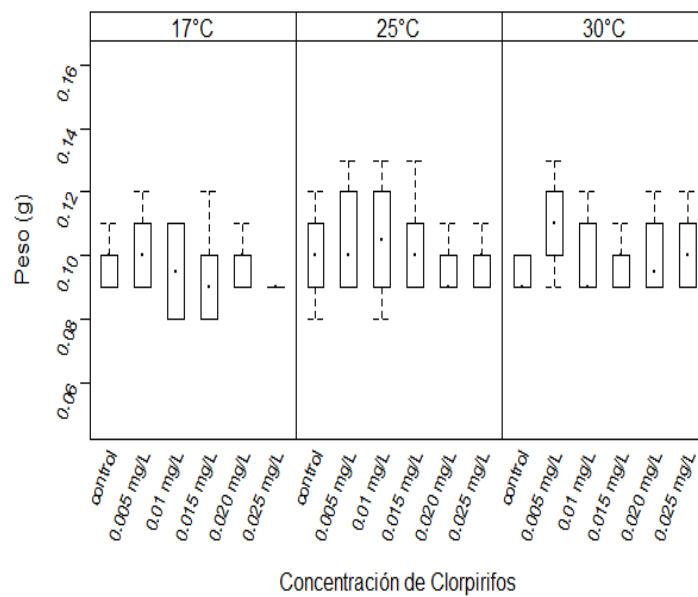


Figura 3: Diagrama de cajas - Pesos de *Poecilia reticulata* según tratamientos

5.2 Condiciones de la prueba

La Figura 4 sugiere que los registros de temperatura en los ensayos son cercanos a la temperatura pre-establecida para cada experimento, la prueba de Bartlett ($\alpha = 0.05$) indica homogeneidad de varianzas en los registros de temperaturas de ensayo 17 °C ($p = 0.28$) y 25 °C ($p = 0.18$), sin embargo la temperatura de 30 °C ($p = 0.02$) rechaza el supuesto de homogeneidad de varianzas (ver Tabla 3, Anexo 3). Asimismo, la prueba de Shapiro – Wilk ($\alpha = 0.05$) rechaza el supuesto de normalidad en las tres temperaturas de ensayo ($p < 0.05$) (ver Tabla 4, Anexo 3). Por lo tanto, para la evaluación de diferencias significativas entre los registros de temperatura de los ensayos se optó por la prueba no-paramétrica de Kruskal – Wallis ($\alpha = 0.05$), los resultados indican que no existen diferencias significativas entre las temperaturas de los tratamientos (ver Tabla 5, Anexo 3).

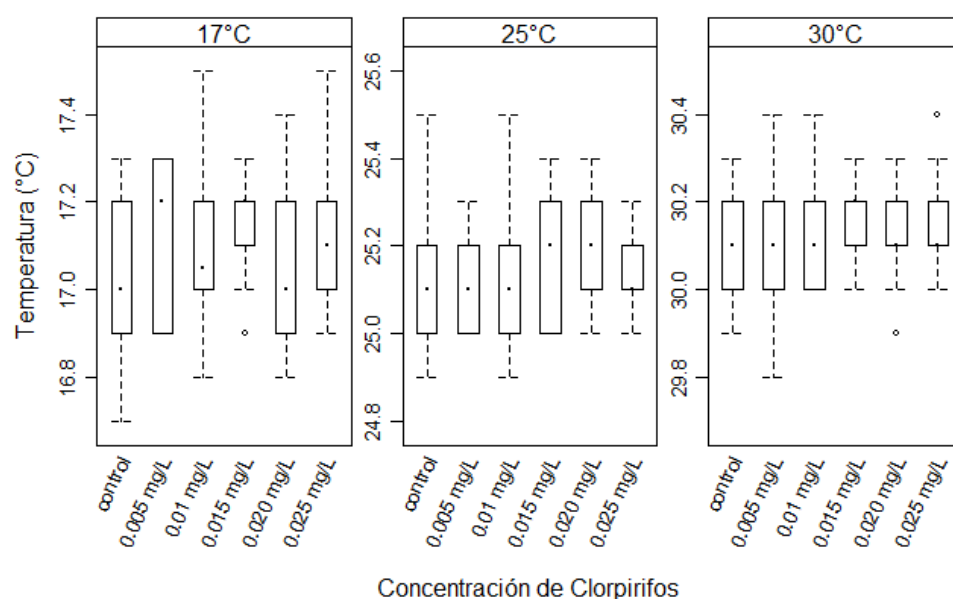


Figura 4: Diagrama de cajas – registros de temperatura de acuarios de tratamientos de Clorpirifos x temperatura

Los parámetros de calidad del agua fueron similares durante los periodos de aclimatación a las temperaturas de ensayo, los registros de amoníaco (0.009 mg/L), nitritos (< 0.1 mg/L), cloro (< 0.02 mg/L) y pH (7.66 – 7.90 unid pH) no superan los valores de toxicidad establecidos por Alabaster (1982) y Lewis & Morris (1986), otros parámetros como la conductividad, alcalinidad, amonio, nitratos, fosfatos y hierro mantienen valores estables y sin variaciones importantes registradas durante el periodo de aclimatación (ver Tabla 8, Anexo 3). Del mismo modo, los parámetros de los acuarios de tratamiento los parámetros iniciales no registraron variaciones importantes en el de amoníaco (0.009 mg/L), nitritos (< 0.1 mg/L), cloro (< 0.02 mg/L) y pH (7.79 – 7.99 unid pH) no superan los límites establecidos, otros de parámetros permanecen estables (ver Tabla 9, Anexo 3).

5.3 Mortalidad de *Poecilia reticulata*

Sólo se registraron individuos muertos en los ensayos realizados a 17 °C, la mortalidad fue dependiente de la concentración de Clorpirifos, la mayor proporción de individuos muertos se registró en la concentración de 0.025 mg/L de Clorpirifos con el 100% de individuos muertos (n = 10), los primeros muertos se registraron a las 56 horas desde el inicio del ensayo y la proporción fue aumentando consecutivamente hasta el fin del tiempo de ensayo pre-determinado (96 h), en segundo lugar la concentración de 0.020 mg/L de Clorpirifos registró hasta el 80% de individuos muertos antes del término del ensayo, en contraste con las concentraciones mayores el grupo control de 0 mg/L de Clorpirifos no registró mortalidad hasta el término de la prueba (ver Figura 5).

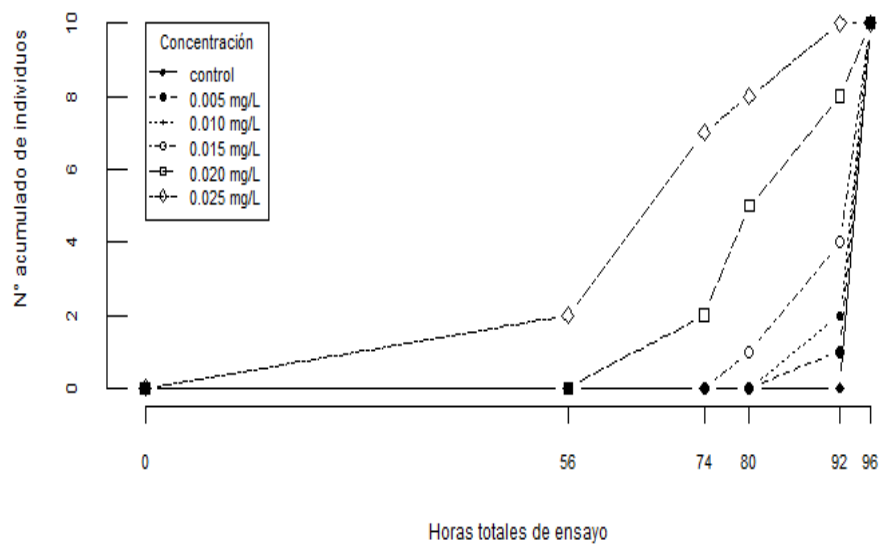


Figura 5: Registro acumulado de individuos muertos de *P. reticulata* a 17°C según la concentración de Clorpirifos

El valor de CL_{50} (95% límites de confianza) calculado para los ensayos de toxicidad aguda de 96 h de Clorpirifos fue 0.015 mg/L (0.012 – 0.017) (ver Figura 6).

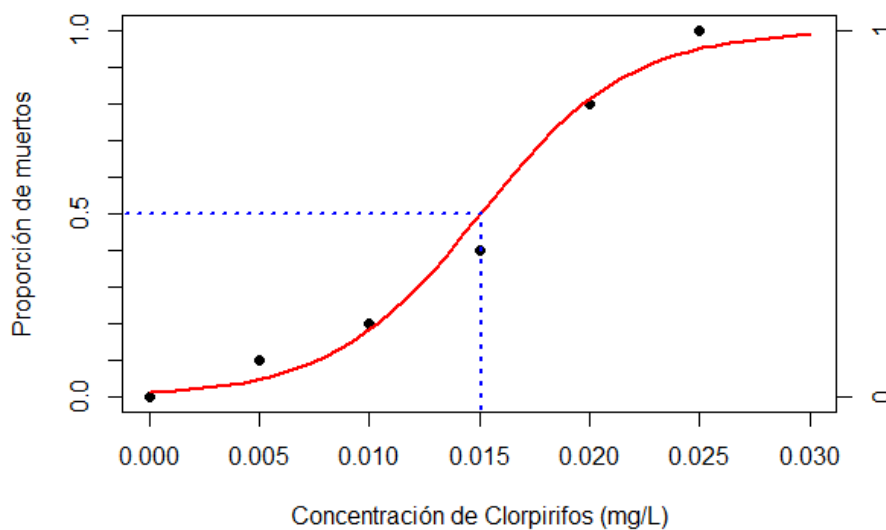


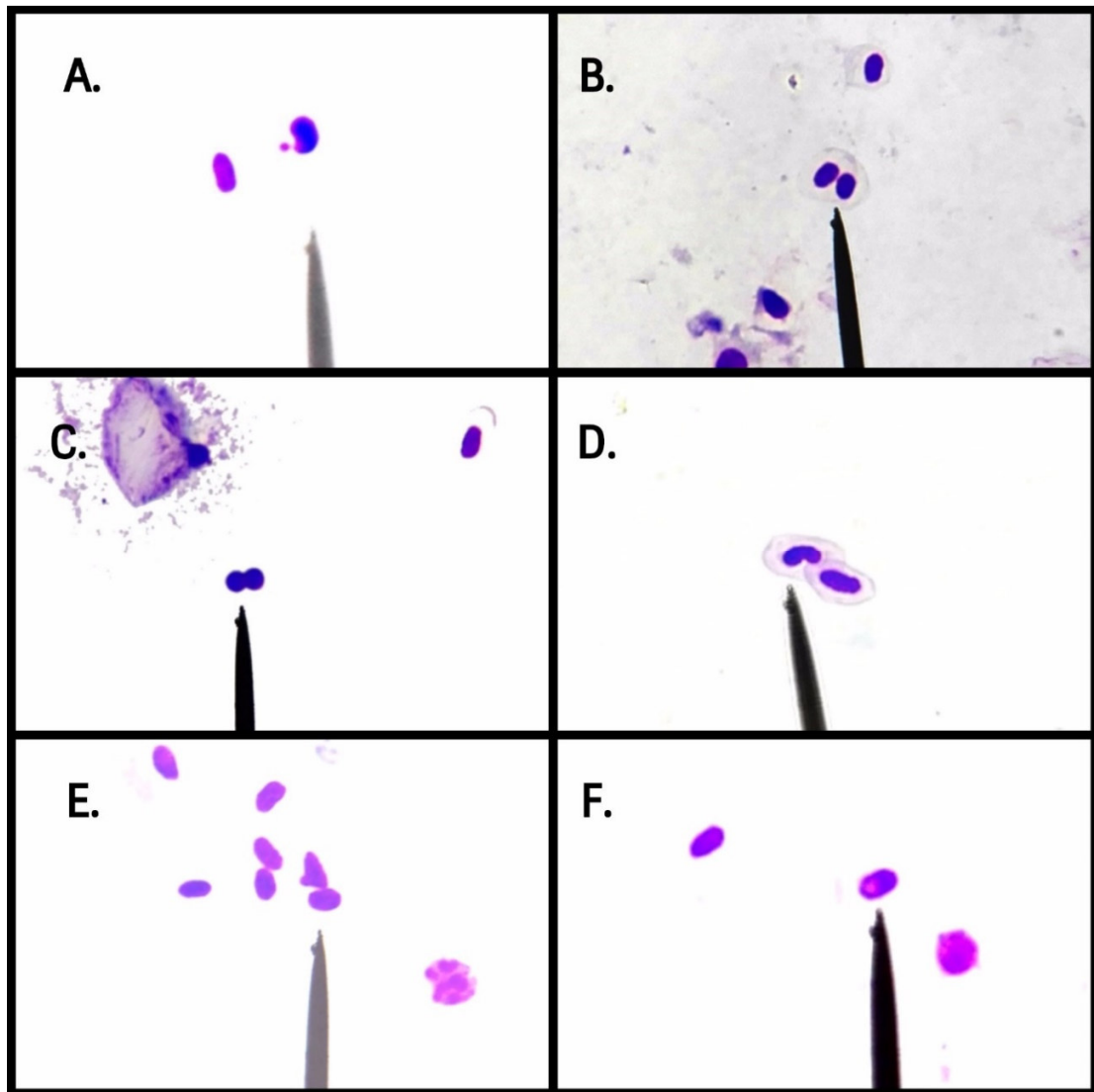
Figura 6: Curva de mortalidad de *P. reticulata* a 17°C

5.4 Anormalidades nucleares y micronúcleos

A continuación, se describen las anormalidades nucleares (AN) reportadas en células epiteliales de branquias de *P. reticulata* las cuales cumplen las características descritas según (Carrasco et. al.,1990):

- Célula normal: Célula oblonga u ovalada con un núcleo central, visiblemente teñido estructurado y bien definido, lo cual facilita el reconocimiento de fragmentos en su citoplasma.
- Micronúcleo (MN): Una, o raramente, múltiples estructuras nucleares supernumerarias observadas dentro del citoplasma de una célula son contadas como un solo micronúcleo si la estructura cumple con tener una forma definida, redonda u ovoide, un diámetro de 1/5 a 1/20 el tamaño de la célula, coloración característica consistente con la cromatina del núcleo principal y una imagen no refractante (Fotografía 1-A).
- Binucleada (BN): Célula con dos estructuras nucleares bien diferenciadas de aproximadamente el mismo tamaño sin uniones entre sí, con la coloración de la cromatina característica de las células normales (Fotografía 1-B)
- Núcleo “Lobulado” (LOB): Núcleo con evaginaciones más grandes que en el caso de los globulados, pero sin la forma bien definida como en el caso anterior. Su morfología va desde abultamientos simples hasta la presencia de múltiples lóbulos, con el patrón de cromatina concentrando heterocromatina en el centro de los lóbulos (Fotografía 1-C).
- Núcleo “Arriñonado” (ARR): Una “mella” es una bien definida hendidura de ancho uniforme extendiéndose apreciablemente hacia el interior del núcleo, no aparenta contener material nuclear y parece estar demarcada por una envoltura nuclear (Fotografía 1-D).

- Núcleo “Globular” (GLOB): Núcleo con pequeñas evaginaciones de la cubierta nuclear la cual parece contener eucromatina o a veces una más oscura heterocromatina. El tamaño de las evaginaciones varía desde una pequeña protrusión a estructuras redondeadas bien definidas (Fotografía 1-E).



**Fotografía 1: Anormalidades nucleares de células del epitelio branquial de *P. reticulata*.
Aumento de 100 X**

- Núcleo “Vacuolado” (VAC): Una “vacuola” en un núcleo aparece como un agujero bien definido desprovisto de cualquier material visible. Las vacuolas aparentan estar demarcadas por una membrana (Fotografía 1-F).

La Tabla 1 muestra el número de anomalías nucleares (AN) cada mil células registradas por tratamiento (temperatura x concentración de Clorpirifos). Los mayores registros de AN corresponden a los micronúcleos cuyo registro más elevado (32.93 ± 3.23 células) corresponde al tratamiento de mayor concentración de Clorpirifos (0.025 mg/L) y la mayor temperatura (30°C), en contraste el registro de micronúcleos para la misma concentración es menor en las temperaturas de 25°C (26.40 ± 3.13) y 17°C (9.53 ± 1.54)⁵; al mismo tiempo los registros de micronúcleos son relativamente similares en los controles independientemente de la temperatura. Respecto a otras AN en segundo lugar están los globulados, lobulados, arriñonados, binucleados y vacuolados, todas las AN muestran la misma tendencia registrando frecuencias más altas en los tratamientos de mayor concentración y temperatura respecto a aquellos con temperaturas más bajas, al mismo tiempo los registros a 25°C son más altos respecto a los de 17°C.

Temperatura de ensayo	Concentración de Clorpirifos	Frecuencia (%) de anomalías nucleares (Promedio \pm Desv. Estándar)					
		Micronúcleo	Binucleado	Globulado	Arriñonado	Lobulado	Vacuulado
17°C	control	3.87 \pm 1.03	1.40 \pm 0.73	3.2 \pm 1.29	2.20 \pm 1.48	2.07 \pm 1.24	1.93 \pm 0.38
	0.005 mg/L	4.73 \pm 1.15	1.67 \pm 0.85	2.73 \pm 1.02	2.80 \pm 0.88	3.00 \pm 1.10	2.33 \pm 1.01
	0.010 mg/L	8.13 \pm 2.17	3.20 \pm 1.57	5.33 \pm 2.04	4.60 \pm 1.11	5.67 \pm 1.89	2.43 \pm 1.21
	0.015 mg/L	13.20 \pm 1.83	5.53 \pm 1.66	8.67 \pm 1.26	7.13 \pm 1.48	5.80 \pm 1.72	4.33 \pm 0.72
	0.020 mg/L	9.13 \pm 2.29	3.47 \pm 1.17	6.40 \pm 1.78	4.80 \pm 1.36	3.60 \pm 1.81	2.87 \pm 0.89
	0.025 mg/L	9.53 \pm 1.54	3.93 \pm 1.31	6.00 \pm 2.20	5.33 \pm 2.72	5.13 \pm 2.06	2.93 \pm 0.47
25°C	control	3.80 \pm 0.89	1.60 \pm 1.18	2.93 \pm 1.34	2.27 \pm 0.78	2.13 \pm 1.47	1.80 \pm 0.55
	0.005 mg/L	8.20 \pm 1.72	2.53 \pm 0.53	4.53 \pm 0.93	4.20 \pm 1.3	3.20 \pm 1.03	2.47 \pm 0.95
	0.010 mg/L	11.60 \pm 2.04	4.87 \pm 1.57	8.00 \pm 1.09	6.13 \pm 1.47	6.20 \pm 2.78	3.93 \pm 0.73
	0.015 mg/L	16.67 \pm 2.65	9.13 \pm 1.91	10.53 \pm 3.03	9.40 \pm 2.36	8.20 \pm 2.35	5.67 \pm 0.85
	0.020 mg/L	19.27 \pm 4.43	8.27 \pm 1.38	14.00 \pm 3.41	11.13 \pm 2.39	12.13 \pm 2.98	6.60 \pm 1.62
	0.025 mg/L	26.40 \pm 3.13	9.93 \pm 1.65	18.07 \pm 2.71	14.20 \pm 2.25	16.87 \pm 4.31	8.73 \pm 1.15
30°C	control	4.20 \pm 0.83	1.80 \pm 0.83	2.87 \pm 1.09	2.27 \pm 0.72	2.27 \pm 0.64	2.00 \pm 0.77
	0.005 mg/L	9.93 \pm 2.19	2.67 \pm 1.37	6.00 \pm 2.01	4.93 \pm 2.02	5.80 \pm 1.30	3.00 \pm 0.72
	0.010 mg/L	17.40 \pm 2.16	5.60 \pm 1.45	13.00 \pm 2.44	9.87 \pm 2.84	10.80 \pm 2.28	5.87 \pm 0.82
	0.015 mg/L	23.33 \pm 3.1	7.80 \pm 1.48	13.93 \pm 3.10	10.80 \pm 1.96	12.80 \pm 1.53	7.73 \pm 1.05
	0.020 mg/L	26.73 \pm 2.14	9.07 \pm 1.3	15.80 \pm 2.69	12.47 \pm 1.72	15.33 \pm 4.52	8.93 \pm 0.84
	0.025 mg/L	32.93 \pm 3.23	9.87 \pm 2.81	19.87 \pm 2.88	15.87 \pm 2.1	15.53 \pm 1.44	10.07 \pm 1.19

Tabla 1: Frecuencias (%) de anomalías nucleares por tratamiento (temperatura x concentración de Clorpirifos)

⁵ Cabe señalar que la alta tasa de mortalidad en los tratamientos a 17°C tiene influencia directa en los resultados finales de los conteos de micronúcleos ya que los individuos no llegan a completar las 96 horas programadas de tratamiento.

5.5 Interacciones de temperatura y concentración de Clorpirifos

Asumiendo un nivel α de 0.05 para la prueba, el análisis principal de PERMANOVA mostró que el término de interacción Temperatura (*Temp*) x Concentración de Clorpirifos (*Conc*) sobre las anomalías nucleares es menor a 0.05 ($p = 0.001$). Así la interacción es significativa, lo cual indica que no es posible interpretar los efectos de cada factor por separado; por otro lado, ambos factores *Temp* y *Conc* respectivamente muestran efectos significativos sobre las frecuencias de anomalías nucleares ($p = 0.001$), ver Tabla 2.

Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedios cuadrados	Pseudo-F	Valor de P	N° de permutaciones
Temperatura (<i>Temp</i>)	2	71.909	35.955	113.33	0.001*	999
Concentración (<i>Conc</i>)	5	225.51	45.101	142.16	0.001*	998
Temp x Conc	10	31.683	3.1683	9.9868	0.001*	996
Residuos	162	51.395	0.31725			
Total	179	380.49				

Tabla 2: Resultados del análisis principal del modelo PERMANOVA

Las comparaciones por pares más específicas (*post-hoc*) realizadas para cada nivel de concentración de Clorpirifos según los grupos de temperatura evaluados (ver Tabla 10, Anexo 3) muestran que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los grupos de temperatura evaluados dentro del grupo control (0 mg/L). En el resto de niveles de concentración de Clorpirifos muestran diferencias significativas entre los grupos de temperatura ($p < 0.05$) sugiriendo un incremento en la frecuencia anomalías nucleares dependiente de la temperatura. La Tabla 11 del Anexo 3, registra las comparaciones *post-hoc* para cada nivel de temperatura según los grupos de concentración de Clorpirifos evaluados, dentro de la temperatura de 17° C no se registraron diferencias significativas entre el control (0 mg/L) y el tratamiento de 0.005 mg/L de Clorpirifos ($p = 0.079$), entre los tratamientos a 0.010 mg/L y 0.025 mg/L ($p = 0.466$), así como entre los tratamientos de 0.020 mg/L y 0.025 mg/L ($p = 0.301$). Las comparaciones no mencionadas mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$), sugiriendo también un incremento de la toxicidad producida por Clorpirifos dependiente de la concentración.

El diagrama NMDS (Figura 7) muestra gráficamente los resultados del análisis PERMANOVA mostrando un gradiente dependiente de la concentración de Clorpirifos, el cual al mismo tiempo se ve influenciado por la temperatura concentrando al lado izquierdo del diagrama las muestras con menores registros de toxicidad y viceversa. Por otro lado, la Figura 10 del Anexo 2, muestra el diagrama de Shepard para el diagrama de NMDS donde los coeficientes de correlación R^2 no-métrico y lineal son cercanos a 1 (0.997 y 0.991 respectivamente) lo cual indica un buen ajuste del modelo a los datos.

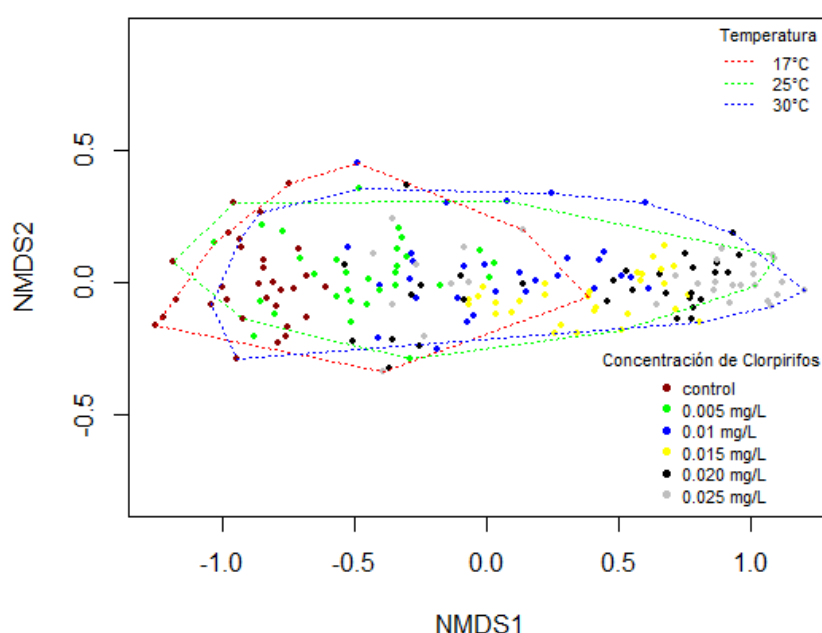


Figura 7: Diagrama NMDS de anomalías nucleares frente a la concentración de Clorpirifos y la temperatura

La Figura 8, muestra los diagramas de interacción para cada variable (anomalías nucleares) mostrando la interacción entre los dos factores evaluados, una interacción ocurre cuando el efecto de un factor es dependiente de un segundo factor en un mismo nivel. Todas las variables evaluadas (MN, BN, GLB, ARR, LOB y VAC) indican interacciones entre los factores de temperatura y concentración de Clorpirifos. Los patrones son similares

en todos los diagramas y las interacciones se dan en todos los niveles de concentración de Clorpirifos y temperatura según lo descrito por el modelo PERMANOVA.

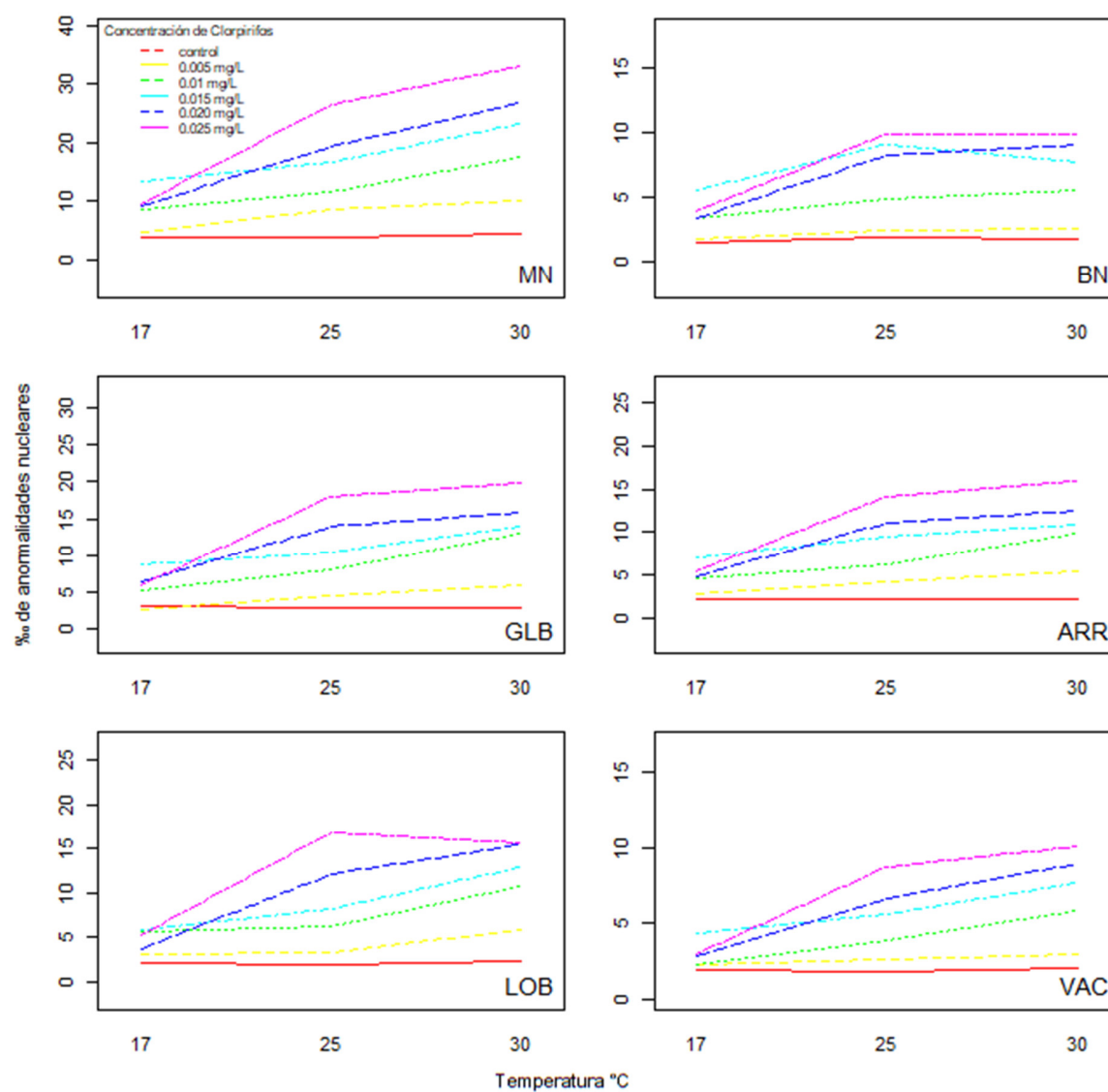


Figura 8: Diagramas de interacción de los factores concentración de Clorpirifos vs Temperatura según las anomalías nucleares

VI Discusión

El presente estudio se realizó usando un método de toxicidad aguda estático de 96 horas evaluando concentraciones sub-letales de Clorpirifos determinadas sobre la base de la concentración letal media (CL₅₀) determinada por Sharbidre, et al. (2011) para *P. reticulata* a 24 ± 2 °C. La homogeneidad de la población de estudio, así como el mantenimiento de las condiciones de calidad de agua reducen al mínimo la presencia de covariables no consideradas dentro del presente estudio que podrían enmascarar los efectos de la concentración de Clorpirifos y la temperatura, así como de sus interacciones, aumentando de este modo la reproducibilidad y repetibilidad del mismo. Las variaciones de temperatura de los tratamientos registradas al mismo tiempo no presentan diferencias significativas entre si por lo que se pueden descartar posibles efectos de shock térmico.

Según Hayashi, et al. (1998) una de las ventajas del ensayo de micronúcleos es que puede ser aplicado a cualquier población de células en proliferación independientemente de su cariotipo, considerando que los peces tienen cromosomas pequeños y el análisis de aberraciones cromosómicas en metafase es difícil, por lo tanto el tamaño o número de cromosomas no afecta el desempeño del ensayo; al mismo tiempo, demuestra que el ensayo de micronúcleos es aplicable a peces marinos y de agua dulce, y que las células del epitelio branquial son más sensibles que las hematopoyéticas a los agentes que inducen micronúcleos. Además, considerando que la mayoría de xenobióticos disueltos o suspendidos en el agua ingresan a través de las branquias, la piel o el tracto gastrointestinal en peces (Ohe, et al., 2004) y que debido a su alta lipofiliidad los organofosforados tienen una alta tasa de absorción por las branquias lo cual se vuelve un factor que contribuye en la sensibilidad del pez en la exposición acuosa (Polat, et al., 2002); por lo tanto se considera válida la elección de células del epitelio branquial para demostrar los efectos genotóxicos provocados por Clorpirifos y sus interacciones con la temperatura del medio.

Lajmanovich, et al. (2014) considera que el ensayo de micronúcleos tiene algunas ventajas sobre otras pruebas que miden el daño genotóxico: 1) puede ser aplicado rápidamente, 2) no es complejo ni caro, 3) su preparación y análisis es simple, y 4) es más rápida que las pruebas de aberraciones cromosómicas. Asimismo, otras anormalidades nucleares como células binucleadas, arriñonadas, globuladas, vacuoladas o lobuladas han sido observadas en eritrocitos de ranas como consecuencia de contaminantes ambientales y químicos con acciones citotóxica, genotóxicas y mutagénicas; sin embargo, los mecanismos de su formación no han sido totalmente explicados y son considerados como indicadores de daño genotóxico, y por tanto pueden complementar los resultados de los conteos de micronúcleos en ensayos de rutina de genotoxicidad (Gökalp , et al., 2011), en este sentido la frecuencia incrementada de anormalidades nucleares (incluyendo micronúcleos) es indicadora de reacciones celulares adversas y/o un mecanismo de inspección para eliminar células con daño genético.

En el presente estudio, micronúcleos y otras anormalidades nucleares fueron detectadas en todos los tratamientos y controles, como sugieren los resultados su frecuencia es dependiente de la concentración de Clorpirifos y de la Temperatura, registrándose mayores frecuencias donde coinciden la mayor temperatura (17°C) y concentración (0.025 mg/L). Se estima que la mortalidad registrada en los tratamientos de 0.025 mg/L y 0.020 mg/L de Clorpirifos a 17°C afecta los conteos finales en estos individuos los cuales presentan diferencias significativas con el control más no con la concentración de 0.015 mg/L. Brunetti et. al. (1992) menciona que la frecuencia de micronúcleos puede variar dependiendo de la especie, el estado fisiológico (p. ej. edad, crecimiento, reproducción) o intensidad de factores abióticos.

Deb & Das (2013) mediante ensayo cometa encontraron que Clorpirifos produjo un incremento dependiente de la concentración en rupturas de cadenas de ADN mediante la

inducción de colas de cometas y una reducción dependiente del tiempo en el daño debido a la reparación del ADN, una posible explicación a esto es que los mecanismos enzimáticos involucrados en el daño al ADN pueden verse perturbados por el contaminante. Como los resultados indican se evidencian diferencias significativas entre los distintos niveles de exposición a Clorpirifos, confirmando sus efectos negativos sobre la estabilidad genética de *P. reticulata*.

Una posible explicación para el daño sobre el material genético observado durante el presente estudio recae sobre el demostrado potencial de Clorpirifos para ocasionar anomalías inmunológicas, daño tisular y producción de especies reactivas del oxígeno (EROs), además de la consecuente inducción de estrés oxidativo (Gupta, et al. 2010). Dado que todos los organismos están expuestos a estas EROs las cuales son capaces de causar daño al ADN, esta amenaza es aliviada por un eficiente sistema de enzimas detoxificantes y de reparación de ADN (Buschini, et al., 2003). Por otro lado, según Lushchak (2011) el estrés oxidativo es una situación cuando la concentración de especies reactivas del oxígeno es trascendental o crónicamente aumentada, perturbando el metabolismo celular, su regulación y sus constituyentes celulares; y los pesticidas organofosforados, como Clorpirifos, pueden producir estrés oxidativo a través de varios mecanismos, la ruptura de las señales neuronales y endocrinas lleva a un influjo intracelular de Ca^{2+} , desencadenando la activación de enzimas proteolíticas, óxido nítrico sintasa, y la generación de radicales libres resultando en estrés oxidativo. Aunque estas EROs regulan varios procesos biológicos mediante regulación de un arreglo de vías de transducción y se presenta en cantidades transitorias en niveles altos y/o sostenidos, el estrés oxidativo puede causar daño severo al ADN, proteínas y lípidos causando disfunciones culminando en la muerte celular (Lau et. al., 2008).

Sin embargo, el incremento de anomalías nucleares observado en el presente estudio no puede ser explicado únicamente por el estrés oxidativo provocado por Clorpirifos, ya que también se observó un incremento de AN dependiente de la temperatura. Al respecto, según Lushchak (2011) está establecido que cualquier estrés fuerte está acompañado por estrés oxidativo, respecto a la temperatura son diversos los mecanismos responsables de la inducción de estrés oxidativo ya sea por incrementos o reducciones de la temperatura ambiental: (1) el incremento de la temperatura estimula los procesos metabólicos en concordancia de los procesos de la termodinámica, esto aumenta el consumo de oxígeno y, por tanto, puede incrementar la producción de EROs como producto secundario del metabolismo intensificado resultando en estrés oxidativo; y (2) de acuerdo a lo mencionado, a bajas temperaturas se podría esperar una reducción del riesgo de estrés oxidativo, aunque los mecanismos no son claros se estima que la reducción de temperatura debilita el sistema de eliminación de EROs y/o aumenta la producción EROs. Por otro lado, Malev, et al. (2010), evaluaron la influencia de diferentes estresores ambientales como la temperatura, exposición al aire y privación de alimento en la integridad del ADN en el cangrejo de río *Astacus leptodactylus*, sus resultados muestran que sólo el incremento de la temperatura (30°C) afecta significativamente el daño de DNA en esta especie, una de las principales razones para esto sería el incremento de EROs en el organismo lo que conllevaría a un consecuente daño genotóxico. En *P. reticulata* los resultados son consistentes con el primer mecanismo, el incremento de la temperatura a 30°C genera un incremento significativo en AN respecto a 25°C, y este a su vez respecto a 17°C, por lo que la toxicidad en términos de genotoxicidad exhibiría una relación lineal respecto a la temperatura.

El estrés térmico, según Brown, et al. (1996) es conocido por resultar en alteraciones en la integridad de los nucleolos además de afectar adversamente la estructura y función del

centrosoma. En *Drosophila melanogaster* Mamon & Kutsikova (1993) observaron anomalías genéticas en larvas en proceso de recuperación del shock térmico. Anitha, et al. (2000) evaluó los efectos genotóxicos del estrés térmico en *Carassius auratus* sometidos a 34, 36 y 38°C demostrando que el exceso de calor induce la formación de micronúcleos en las tres temperaturas estudiadas, además de inhibir la proliferación celular (a 38°C) y causar aberraciones cromosómicas en metafase (34 y 36°C); por lo tanto, es razonable que el shock térmico sea un genotóxico.

Por otro lado, sólo se reportó mortalidad a 17°C y la tasa de mortalidad fue dependiente de la concentración se estima que esto se debe a una reducción de la tolerancia al estrés térmico de *P. reticulata*. Deb & Das, (2013) reporta la concentración letal media CL₅₀ de 96h para Clorpirifos de grado técnico para *Lepomis macrochirus* en 0.0033 mg/L, 0.003 mg/L para *Onchorhynchus mykiss*, 0.0134 para *Ictalurus punctatus*, para Clorpirifos 97% de ingrediente activo en 0.098 mg/L para *Salvelinus namaycush*, 0.018 mg/L para *Salmo darki*, 0.203 mg/L para *Pimphales promelas*, 0.035 mg/L para *Notemigonus crysoleucas*, 0.09867 mg/L para *Oreochromis niloticus* juvenil, 0.154 mg/L para *Oreochromis niloticus* adulta, 297 mg/L para *Gambusia affinis* y 0.580 mg/L para *Cyprinus carpio*, los registros de toxicidad reportados han sido realizados a la temperatura óptima para cada una de las especies por lo que la toxicidad es altamente variable dependiendo de la especie. Ma, et. al. (2013) sugiere que las variaciones en la toxicidad ocasionada por Clorpirifos puede estar causada por diferencias en especies de peces, edad, estado fisiológico y diferentes condiciones de laboratorio, tal como temperatura y calidad de agua. Por otro lado, la CL₅₀ calculada para *P. reticulata* ha sido calculada en 0.015 mg/L (del compuesto activo de Pyrinex) lo cual difiere significativamente de lo reportado por Sharbidre, et al., (2011).

Con respecto a la reducción de la CL₅₀ registrada a 17°C con respecto a lo que reportó Sharbidre , et al., (2011). Bao, et al. (2008) establecieron que empíricamente los

organismos acuáticos no pueden sobrevivir a temperaturas extremadamente bajas o altas; y a través de la exposición aguda a extremos desde la temperatura óptima los organismos a menudo muestran un incremento exponencial en la mortalidad acumulativa hacia temperaturas en los extremos altos y bajos desde la temperatura óptima, así la relación entre la temperatura y la curva acumulativa de mortalidad asemeja la forma de U. En el caso particular de *P. reticulata* Meffe & Snelson (1989) sostienen que el rango óptimo está entre 20 y 32°C este hecho sustenta el incremento de la mortalidad a 17°C se debe a principalmente a que *P. reticulata* está fuera de su rango óptimo. Esto, sin embargo, no se debe únicamente a la temperatura si no que la mortalidad, tal como se observa en los resultados, es dependiente de la concentración de Clorpirifos. Zhou, et al. (2014), sostienen que a bajas temperaturas hay una circulación restringida debido a la tasa cardíaca reducida y vasoconstricción, mientras se da la circulación reducida de la sangre los animales tienen una cantidad limitada de oxígeno lo que los lleva a un desajuste energético que los obliga entrar en respiración anaeróbica seguido de muerte. Los resultados indican que este proceso puede verse acelerado por la presencia de xenobióticos, en este caso por Clorpirifos ya que la mortalidad a 17°C además es dependiente de la concentración registrándose tasas de mortalidad de hasta el 100% de los individuos en la concentración más alta (0.025 mg/L de Clorpirifos).

Respecto a las interacciones entre temperatura y Clorpirifos, Heugens, et al. (2001) propone que múltiples factores de estrés pueden cambiar la sensibilidad de un organismo en dos formas (1) la exposición de estrés a una sustancia tóxica puede reducir el rango de tolerancia a factores ambientales; y (2) estos factores pueden influenciar en el efecto tóxico de estos compuestos. La condición fisiológica de un organismo puede ser modificada por la variación de temperatura, por ejemplo, por la inducción de proteínas protectoras contra el calor o frío, las cuales pueden influenciar en la sensibilidad a los contaminantes y de este

modo en los límites de tolerancia térmica la exposición a contaminantes puede agravar los efectos adversos de los efectos termales (Donker, et al., 1998).

Según Lushchak (2011) cambios en la temperatura, niveles de oxígeno y salinidad pueden causar estrés en condiciones naturales y artificiales vía inducción de un desbalance en la producción y eliminación de EROs, el rol de pesticidas (insecticidas, herbicidas y fungicidas) también producen estrés oxidativo y, aunque los organismos acuáticos poseen sistemas para la degradación de radicales libres, los cuerpos de agua reciben un número creciente de químicos de la industria y agricultura siendo asimilados por los organismos y pudiendo producir radicales libres, su asimilación puede ocurrir desde el agua, sedimentos, material particulado suspendido y fuentes de alimento. Por otro lado, Anitha, et al. (2000) menciona que la respuesta fisiológica está relacionada con la regulación genética en la cual condiciones extremas de estresores, incluyendo exposición de contaminantes puede afectar de forma negativa este nivel.

Aunque no se ha evaluado la relación específica de concentraciones sub-letales Clorpirifos y la temperatura a la que están expuestos *P. reticulata* u otros peces de agua dulce, si se ha evaluado la interacción de otros contaminantes y la temperatura ambiental sobre la estabilidad genética en otros organismos. En este sentido, Sotil, et al. (2008) evaluaron los efectos de la mitomicyna C sobre la estabilidad genética de los bivalvos *Semimitylus albus* y *Brachiodontes purpuratus* simulando condiciones hipotéticas de El Niño y la Niña a 23 y 11°C respectivamente, sugiriendo que especies del intermareal rocoso como *B. purpuratus* las cuales están sujetas a constante estrés térmico y de desecación, presentarían adaptaciones que les permite resistir mejor los efectos de las altas temperaturas, y por lo tanto moderar los efectos de las interacciones entre contaminantes y temperaturas extremas. Por otro lado, Buschini, et al. (2003) mediante ensayo cometa en hemocitos del bivalvo *Dreissena polymorpha* encuentran que los cambios de

temperatura originados por variaciones estacionales generan daño a nivel de rupturas de cadena de ADN en animales sin tratar e incrementan la sensibilidad hacia contaminantes ambientales, y por lo tanto se necesitaría más información sobre las variaciones estacionales y naturales detrás de los niveles de daño de DNA en organismos de vida libre, al mismo tiempo, sugieren que los efectos de la temperatura podrían ser modulados (o modular), por los efectos de los contaminantes en el agua en relación a cambios estacionales. Igualmente, Hayashi, et al. (1998) en un estudio de campo con *Leiognathus nuchalis* y *Ditrema temmincki* especies de pequeños peces marinos costeros colectados estacionalmente registraron diferencias estacionales en las frecuencias de micronúcleos en células de branquias y eritrocitos encontrando que estos fueron más altos en verano. Según lo mencionado, las interacciones entre contaminantes y la temperatura ambiental, puede ocurrir por cambios de temperatura inducidos (como en el presente trabajo), o por variaciones naturales de temperatura en el medio natural como la estacionalidad, eventos climáticos extremos como el Niño o la Niña, y tampoco se pueden descartar posibles efectos de cambios de temperatura a largo plazo ocasionados por el cambio climático.

Otro posible mecanismo de interacción es la bioacumulación del contaminante en el cuerpo del organismo expuesto. Lydy, et al. (1999) evaluaron el efecto de la toxicidad de Clorpirifos en *Chironomus tentans* a 10, 20 y 30°C reportando incrementos de la toxicidad de Clorpirifos a 30° y 20°C, sin embargo la concentración de Clorpirifos en el cuerpo a 30°C fue significativamente menor que 20°C, esto puede ser atribuido a cambios relativos en la tasa de asimilación, eliminación y biotransformación del organismo, de modo que al incrementarse la temperatura, se incrementa el metabolismo, y por lo tanto la asimilación del químico y posiblemente la biotransformación y su eliminación. No debería descartarse que mecanismos similares apliquen para *P. reticulata*, debido a que no se evaluó la

concentración de Clorpirifos en tejido y esta podría tener efectos diferenciados en exposiciones prolongadas del contaminante.

Zhou, et al. (2014), establecieron que la toxicidad química generalmente sigue dos diferentes modelos: (1) esta se incrementa con la temperatura; y (2) esta es menor en la temperatura óptima y aumenta con el incremento o reducción a partir de la temperatura óptima. Considerando que los ensayos a 25°C pueden considerarse como a temperatura óptima para *P. reticulata*, los resultados obtenidos sugieren que el modelo observado en el presente trabajo responde a la segunda hipótesis, debido al hecho de que: si bien se registra una mayor incidencia de micronúcleos a las temperaturas de 30°C y 25°C respecto a 17°C, la mortalidad se incrementa de manera significativa a 17°C.

Heugens, et al. (2001) menciona que, considerando que las condiciones ambientales variables y sub-óptimas son aspectos comunes para la mayoría de especies en su medio natural, el peligro de subestimación de riesgo ecológico aumenta. Las interacciones entre los contaminantes y el medio sobre los organismos pueden ser explicadas por varios procesos físicos y fisiológicos en factores tales como la biodisponibilidad y la toxicoquinesis de los organismos que dificultan el acoplamiento de los resultados de las pruebas de toxicidad estándar a las situaciones observadas en el campo.

Tal como se demuestra, las interacciones del contaminante (Clorpirifos) y la temperatura, tienen efectos sobre la estabilidad genética y la supervivencia de *P. reticulata* que no se observaría si se analizaran por separado. Chapman (2016) menciona que los protocolos de evaluación de la toxicidad no han sido diseñados para investigar la manifestación de la toxicidad en ambientes fríos de agua dulce y es típicamente llevada a cabo en un laboratorio en un ambiente más cálido de lo que se encuentra en el campo y por periodos determinados de tiempo, lo que llevaría a una subestimación de la toxicidad y una sobreestimación de las concentraciones que no evidencian efectos negativos sobre la biota; y considerando que la

calidad del agua puede ser un determinante clave para el futuro desarrollo de la hidrobiología, tanto la diversidad biológica y el estado fisiológico son índices directos de la calidad de agua, Lushchak (2011) puntualiza en que el uso extensivo de enfoques matemáticos y estadísticos multivariados deberían ser utilizados para determinar la significancia estadística de múltiples biomarcadores o especímenes individuales de modo que permitan discriminar lo estadísticamente importante de lo irrelevante, aunque el presente estudio se centró únicamente en dos factores de estrés las interacciones entre contaminantes y otras variables fisicoquímicas podrían analizarse más profundamente.

Así para la evaluación química de los efectos de la temperatura sobre el efecto de agentes tóxicos debería considerarse la temperatura promedio del agua en la región y al mismo tiempo la temperatura óptima del organismo de evaluación, el presente estudio muestra que la toxicidad química de Clorpirifos es compleja y altamente dependiente de la concentración además de la temperatura. Extremos climáticos tales como eventos El Niño y La Niña, el calentamiento global o descargas de agua residual pueden inducir estrés térmico en poblaciones naturales de peces y otros organismos acuáticos con efectos sinérgicos sobre la genotoxicidad.

De este modo, los resultados obtenidos pueden ser interpretados como un acercamiento al nuevo paradigma propuesto por Noyes, et al. (2009) de identificar las especies y poblaciones especialmente vulnerables a las interacciones clima-contaminante, en el contexto de muchos otros factores de estrés físicos, químicos y biológicos que serán alterados con el cambio climático; y más aún, es importante predecir los puntos de inflexión que podrían retrasar o acelerar las interacciones sinérgicas entre el cambio climático y la exposición a contaminantes, específicamente para los pesticidas entre los efectos más significativos del cambio climático son los cambios en la agricultura, cambiando la localización y tipos de cultivo, así como el rango y la magnitud del uso de pesticidas.

VII Conclusiones

Sobre la base de los resultados y discusiones se puede concluir que:

1. En *Poecilia reticulata* la genotoxicidad expresada en términos de frecuencia de micronúcleos y otras anormalidades nucleares, así como la mortalidad son dependientes tanto de la temperatura como de la concentración de Clorpirifos.
2. Los resultados han permitido establecer la concentración letal media LC₅₀ de Clorpirifos (Pyrinex ®) para *P. reticulata* de 0.015 mg/L a 17°C, la cual es significativamente menor a la reportada para la misma especie dentro de su rango de temperatura óptima, por lo tanto, el contaminante reduce el umbral inferior de tolerancia a la temperatura.
3. Se pone en evidencia que las interacciones de temperatura y Clorpirifos, poseen mecanismos de toxicidad diferenciados según la temperatura: (1) por un lado, el incremento de temperatura afecta significativamente la estabilidad genética, no se observó mortalidad; y (2) a baja temperatura, por el contrario, se observa una frecuencia de anormalidades nucleares reducida y una elevación en la tasa de mortalidad; a 25°C (temperatura óptima de *P. reticulata*) la formación de anormalidades nucleares es menor que a 30° y sin mortalidad.
4. Se confirma el alto riesgo de Clorpirifos y sus interacciones en el ambiente acuático, su contaminación puede presentar una fuerte amenaza a la estabilidad genética de poblaciones de peces.
5. Los ensayos de toxicidad deberían ser conducidos en múltiples temperaturas realistas o al menos conteniendo los límites superior, inferior y óptimo de la especie evaluada.
6. Por la puesta en evidencia de los efectos de las interacciones de la temperatura y pesticidas, los resultados de la presente investigación pueden ser tomados en

consideración en el contexto de la estacionalidad, eventos climáticos extremos, cambio climático y de cambios en la actividad agrícola e industrial.

VIII Recomendaciones

1. Evaluar las interacciones de otras variables ambientales (p. ej. Salinidad, concentración y saturación de oxígeno, dureza, etc.) sobre la acción de Clorpirifos en *P. reticulata* y otras especies de interés.
2. Evaluar las interacciones en experimentos de campo que permitan validar la información producida por el presente estudio.
3. Considerar los cambios de temperatura naturales tales como la estacionalidad sobre el deterioro de la estabilidad genética producido por Clorpirifos en poblaciones naturales de peces teleósteos y otros organismos.

IX Referencias Bibliográficas

- Alabaster, J. S. (1982). *Water quality criteria for freshwater fish* (Segunda ed.). London: Butterworths.
- Ali, D., Nagpure, N. S., Kumar, S., Kumar, R., & Kushwaha, B. (2008). Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Chemosphere*(71), 1823-2831.
- Al-Sabti, K. (2000). Chlorotriazine reactive Azo Red 120 textile dye induces micronuclei in fish. *Ecotoxicology and Encironmental Safety*, 47, 149-155.
- Al-Sabti, K., Franko, M., Andrijanic, B., Knez, S., & Stegnar, P. (1994). Chromium-induced micronuclei in Fish. *Journal of Aplied Toxicology*, 13(5), 333-336.
- Anderson, M. J. (2001). A new metho for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, 26, 32-46.
- Anderson, M. J. (2005). *PERMANOVA. Permutational multivariate analysis of variance*. Auckland: Departament of Statistics, University of Auckland.
- Anderson, M. J., Gorley, R. N., & Clarke, K. R. (2008). *PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to software and Statistical Methods*. Auckland: University of Auckland and PRIMER-E, Plymouth.
- Angilletta, M. J. (2009). *Thermal Adaption: A theoretical and empirical synthesis*. Oxford University Press.
- Anitha, B., Chandra, N., Gopinath, P., & Durairaj, G. (2000). Genotoxicity evaluation of heat shock in gold fish (*Carassius auratus*). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 469(1), 1-8.

- Antunes-Madeira, M. C., & Madeira, V. M. (1979). Interaction of insecticides with lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*(550), 384-392.
- Arkhipchuk, V. V., & Garanko, N. N. (2005). Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*(62), 42-52.
- Arslan, Ö. Ç., Boyacioglu, M., Parlak, H., Kalatay, S., & Karaaslan, M. A. (2015). Assessment of micronuclei induction in peripheral blood and gill cells of some fish species from Aliaga Bay Turkey. *Marine Pollution Bulletin*(94), 48-54.
- Ateeq, B., Farah, A., Niamat, A., & Ahmad, W. (2002). Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. *Mutation Research*, 518, 135-144.
- ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (1997). *Toxicological profile for chlorpyrifos. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services.*
- Baatrup, E., & Junge, M. (2001). Atiandrogenic pesticides disrupt sexual characteristics in the adult male Guppy (*Poecilia reticulata*). *Environmental Health Perspectives*, 109(10), 1063-1070.
- Bagchi, D., Balmoori, J., Bagchi, M., Ye, X., Williams, C. B., & Stohs, S. J. (2002). Comparative effects of TCDD, endrin, naphthalene and chromium (VI) on oxidative stress and tissue damage in the liver and brain tissues of mice. *Toxicology*(175), 73-82.
- Bao, V. W., Koutsaftis, A., & Leung, K. M. (2008). Temperatura-dependent toxicities of chlorothalonil and cooper pythione to the marine copepod 'Tigriopus japonicus' and dinoflagellate 'Pyrocystis lunula' . *Australasian Journal of Ecotoxicology*, 14(2/3), 45.

- Barbosa, J. S., Cabral, T. M., Ferreira, D. N., Agnez-Lima, L. F., & Batistuzzo de Medeiros, S. R. (2010). Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 320-325.
- Barron, M. G., & Woodburn, K. B. (1995). Ecotoxicology of Chlorpyrifos. En A. Bevenue (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Primera ed.). New York, USA: Springer-Verlag.
- Beitinger, T. L., & Lutterschmidt, W. I. (2011). Measures of thermal tolerance. En A. P. Farrel, D. E. Stevens, J. J. Cech, & J. G. Richards (Edits.), *Encyclopedia of fish physiology: From genome to environment* (Primera ed.). London, UK: El Sevier Inc.
- Beitinger, T., & Bennett, W. A. (2000). Quantification of the role of acclimation temperature in temperature tolerance of fishes. *Environmental Biology of Fishes*, 58, 277-288.
- Bennett, W. A., McCauley, R. W., & Beitinger, T. L. (1998). Rates of gain and loss of heat tolerance in channel catfish. *Transactions of the American Fisheries Society*(127), 1051-1058.
- Berthet, B. (2013). Sentinel Species. En C. Amiard-Triquet, J. C. Amiard, & P. S. Rainbow (Edits.), *Ecological Biomarkers: Indicator of Ecotoxicological Effects*. NW: Taylor & Francis Group.
- Bettelheim, F. A., Brown, W. H., Campbell, M. K., Farrel, S. O., & Torres, O. J. (2013). *Introduction to general, organic and biochemistry*. Belmont, USA: Cengage Learning.
- Bhatnagar, A., Singh Yadav, A., & Cheema, N. (2016). Genotoxic effects of Chlorpyrifos in freshwater fish *Cirrhinus mrigala* using micronucleus assay. *Advances in Biology*, 2016, 1-6.

- Bloomfield, J., Williams, R., Gooddy, D., Cape, J., & Guha, P. (2006). Impacts of climate change on the fate and behaviour of pesticides in surface and groundwater -a UK perspective. *Science of the total Environment*, 369(1), 163-177.
- Bollmohr, S., Day, J., & Schulz, R. (2007). Temporal variability in particle-associated pesticide exposure in a temporary open estuary, Western Cape, South Africa. *Chemosphere*, 68(3), 479-488.
- Bolognesi, C., & Hayashi, M. (2011). Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, 26(1), 205-213.
- Braunbeck, T., & Segner, H. (1992). Preexposure temperature acclimation and diet as modifying factors for the tolerance of Golden Ide (*Leuciscus idus melanotus*) to short-term exposure to 4-Chloroaniline. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 24, 72-94.
- Brown, R., Brown, H., Doxsey, J., & Welch, W. (1996). Molecular chaperones and the centrosome a rol for HSP 73 in centrosomal repair following heat sohck treatment. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(2), 833-840.
- Brunetti, R., Gabriele, M., Valerio, P., & Fumagalli, O. (1992). The micronucleus test: temporal pattern of baseline frequency in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Ecology Progress Series*, 83, 75-78.
- Buschini, A., Carboni, P., Martino, A., Poli, P., & Rossi, C. (2003). Effects of temperature on baseline and genotoxicant-induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 537(1), 81-92.

- CABI . (2016). *Poecilia reticulata* [texto original por J. Lyndon]. *Invasive Species Compendium*. Wallingford, UK: CAB International. www.cabi.org/isc. Recuperado el 12 de 05 de 2016
- Campana, M., Panzeri, A., Moreno, V., & Dulout, F. (1999). Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. *Mutation Research*, 438, 155-161.
- Carrasco, K. R., Tilbury, K. L., & Myers, M. S. (1990). Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47, 2123-2136.
- Castaño, A., Carbonell, G., Carballo, M., Fernández, C., Fernandez, C., Boleas, S., & Tarazona, J. (1998). Sublethal effects of repeated intraperitoneal cadmium injections on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 41, 29-35.
- Cavas , T., Garanko, N. N., & Arkhipchuk, V. V. (2005). Inductoin of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 569-574.
- Cavas, T., & Serpil, K. (2007). Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis*, 22(4), 263-268.
- Chang, R., & Overby, J. (2011). *General Chemistry: The Essential Concepts* (Sexta ed.). New Yorl. NY: McGraw-Hill.
- Chapman, P. M. (2016). Toxicity delayed in cold freshwaters? *Journal of Great Lakes Research*, 42(2), 286-289.

- Chapman, P. M., & Riddle, M. J. (2005). Toxic effects of contaminants in polar marine environments. *Environmental Science Technology*, 39, 200A-206A.
- Cossins, A. R., & Bowler, K. (1987). *Temperature biology of animals*. New York, USA: Chapman and Hall.
- Deb, N., & Das, S. (2013). Chlorpyrifos toxicity in fish: A review. *Current World Environment*, 8(1), 77-84.
- Deepayan, S. (2008). *Lattice: Multivariate Data Visualization with R*. New York: Springer.
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., & Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Radical Biology & Medicine*, 32(11), 1102-1115.
- Donker, M. H., Abdel-Lateif, H. M., Khalil, M. A., Bayoumi, B. M., & Van Straalen, N. M. (1998). Temperature, physiological time, and zinc toxicity in the isopod *Porcellio scaber*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(8), 1558-1563.
- Farah, A., Ateeq, B., Ali, N., & Ahmad, W. (2003). Evaluation of genotoxicity of PCP and 2,4-D by micronucleus test in freshwater fish *Channa punctatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54, 25-29.
- Galloway, S., Lorge, E., Aardema, M., David, E., Fellows, M., Heflich, R., . . . Speit, G. (2011). Workshop summary: Top concentration for in vitro mammalian cell genotoxicity assays; and report from working group on toxicity measures and top concentration for in vitro cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus). *Mutation Research*(723), 77-83.
- Georgescu, B., Boaru, A., & Georgescu, C. E. (2013). Endocrine control of reproduction in the guppy fish (*Poecilia reticulata*). *International Journal of the Bioflux Society*, 3(1), 1-6.

- Gökalp Muranli, F. D., & Güner, U. (2011). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Mutation Research*, 726, 104-108.
- Gupta, S. C., Mishra, M., Sharma, A., Balaji, T. D., Kumar, R., Mishra, R. K., & Chowdhuri, D. K. (2010). Chlorpyrifos induces apoptosis and DNA damage in *Drosophila* through generation of reactive oxygen species. *Ecotoxicology and environmental safety*, 73(6), 1415-1423.
- Hayashi, M., Ueda, T., Uyeno, K., Wada, K., Kinae, N., Saitome, K., . . . Ojima, Y. (1998). Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutation Research*(399), 125-133.
- Heddle, J. A., Suart, E., & Salamone, M. F. (1984). The bone marrow micronucleus test. En B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, & C. Ramel (Edits.), *Handbook of mutagenicity test procedures* (Segunda ed., págs. 441-457). Elsevier Science Publishers.
- Hermens, J., & Leeuwangh, P. (1982). Joint toxicity of mixtures of 8 and 24 chemicals to the Guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 6, 302-310.
- Heugens, E. H., Hendriks, A. J., Dekker, T., Straalen, N., & Admiraal, W. (2001). A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factors for use in risk assessment. *Critical reviews in toxicology*, 31(3), 247-284.
- Hill, R. W., Wyse, G. A., & Anderson, M. (2012). *Animal Physiology* (Tercera ed.). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc.
- Hooftman, R. N., & de Raat, W. K. (1982). Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmea* by ethyl methanesulphonate. *Mutation Research*(104), 147-152.

- Hoshina, M., De Franceschi de Angelis, D., & Marin-Morales, M. (2008). Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. *Mutation Research*, 656, 44-48.
- IMARPE - Instituto del Mar del Perú. (2007). Monitoreo poblacional de camarón de río estimación de abundancia de adultos en ríos de la costa centro sur. *Informe Anual 2007 - Unidad de Investigaciones en Recursos de Aguas Continentales*.
- Jobling, M. (1997). Temperature and growth: modulation of growth rate via temperature change. En C. M. Wood, & D. G. McDonald (Edits.), *Global warming: Implications for freshwater and marine fish*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Johnson, W. W., & Finley, M. T. (1980). Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates. *Summaries of Toxicity tests conducted at Columbia National Fisheries Research Laboratory, 1965-78*.
- Keizer, J., D'Agostino, G., & Vittozzi, L. (1991). The importance of biotransformation in the toxicity of xenobiotics to fish. I. Toxicity and bioaccumulation of diazinon in guppy (*Poecilia reticulata*) and zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Aquatic toxicology*, 21, 239-254.
- Koshlukova, S. E., & Reed, N. R. (2014). Chlordane. En P. Wexler, M. Abdollahi, A. De Peyster, S. C. Gad, H. Greim, S. Harper, . . . T. J. Wiegand (Edits.), *Encyclopedia of Toxicology* (Tercera ed.). London, UK: El Sevier, Inc.
- Laetz, C. A., Hetch, S. A., Incardona, J. P., Collier, T. K., & Scholz, N. L. (2015). Ecotoxicological risk of mixtures. En C. Amiard-Triquet, J.-C. Amiard, & C. Mouneyrac (Edits.), *Aquatic Ecotoxicology: Advancing tools for dealing with emerging risks* (Primera ed.). London, UK: El Sevier Inc.

- Lajmanovich, R. C., Cabagna-Zenklusen, M. C., Attademo, A. M., Junges, C. M., Peltzer, P. M., Bassó, A., & Lorenzatti, E. (2014). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. *Mutation Research*, 769, 7-12.
- Lanno, R. P., Hickie, B. E., & Dixon, D. G. (1989). Feeding and nutritional considerations in aquatic toxicology. En M. Munawar, G. Dixon, C. I. Mayfield, T. Reynoldson, & M. H. Sadar (Edits.), *Environmental bioassay techniques and their application* (Primera ed.). Springer-Science.
- Lau, A. T., Wang, Y., & Chiu, J. F. (2008). Reactive oxygen species: current knowledge and applications in cancer research and therapeutic. *Journal of cellular biochemistry*, 104(2), 657-667.
- Lee, R. F., & Steinert, S. (2003). Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*(544), 43-64.
- Lewis, W. M., & Morris, P. D. (1986). Toxicity of nitrite to fish: A Review. *Transactions of the American Fisheries Society*(115), 183-195.
- Lushchak, V. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology*, 101(1), 13-30.
- Lydy, M., Belden, J., & Ternes, M. (1999). Effects of temperature on the toxicity of M-parathion, chlorpyrifos, and pentachlorobenzene to *Chironomus tentans*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37(4), 542-547.
- Ma, J., Yang, L., Daichun, N., & Xiaoyu, L. (2013). Effects of Chlorpyrifos on the transcription of CYP3A cDNA, activity of acetylcholinesterase, and oxidative stress response of goldfish (*Carassius auratus*). *Environmental Toxicology*, 30(4), 422-429.

- Magnuson, J. J., & de Stasio, B. T. (1997). Thermal niche of fishes and global warming. En C. M. Wood, & D. G. McDonald (Edits.), *Global warming: Implications for freshwater and marine fish* (Primer ed.). Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Malev, O., Šrut, M., Maguire, I., Štambuk, A., Ferrero, E., Lorenzon, S., & Klobučar, G. (2010). Genotoxic, physiological and immunological effects caused by temperature increase, air exposure or food deprivation in freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 152(4), 433-443.
- Mamon, L., & Kutsikova, A. (1993). The role of heat shock proteins in high temperature induced damages of mitotic chromosome in *Drosophila melanogaster*. *Genetika*, 29(4), 604 - 612.
- Matthews, M., & Varga, Z. (2012). Anesthesia and euthanasia in zebrafish. *ILAR Journal*, 53(2), 192-204.
- Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F., & Heddle, J. A. (1990). The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*(239), 29-80.
- Meffe, G. K., & Snelson, F. F. (1989). An ecological overview of Poeciliid fishes. *Ecology and evolution of livebearing fishes (Poeciliidae)*, 13-31.
- Miliou, H., Zaboukas, N., & Moraitou-Apostolopoulou, M. (1998). Biochemical composition, growth, and survival of the Guppy, *Poecilia reticulata*, during chronic sublethal exposure to cadmium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35, 58-63.

- MINAM - Ministerio del Ambiente. (2008). Aprueban los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua. *Decreto Supremo N° 002-2008-MINAM*.
- Nepomuceno, J. C., Ferrari, I., Spanó, M. A., & Centeno, A. J. (1997). Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to metallic mercury. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 30, 293-297.
- Noyes, P., McElwee, M., Miller, H., Clark, B., Van Tiem, L., Walcott, K., . . . Levin, E. (2009). The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world. *Environmental International*, 35(6), 971-986.
- Odum, E. P. (1985). Trends expected in stressed ecosystems. *BioScience*, 35(7), 419-422.
- Ohe, T., Watanabe, T., & Wakabayashi, K. (2004). Mutagens in surface waters a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 567(2), 109-149.
- Olsvik, P. A., Softeland, L., Hevroy, E. M., Rasinger, J. D., & Waagbo, R. (2016). Fish pre-acclimation temperature only modestly affects cadmium toxicity in Atlantic salmon hepatocytes. *Journal of Thermal Biology*, 57, 21-34.
- Ortega, H., Guerra, H., & Ramírez, R. (2007). The introduction of nonnative fishes into freshwater systems of Peru. En T. Bert (Ed.), *Ecological and Genetic Implications of Aquaculture Activities* (págs. 247-278). Springer.
- Palma, P., Alvarenga, P., Palma, V., Matos, C., Fernandes, R., Soares, A., & Barbosa, I. (2010). Evaluation of surface water quality using an ecotoxicological approach: a case study of the Alqueva Reservoir (Portugal). *Environmental Science and Pollution Research*, 17(3), 703-716.
- Patra, R. W., Chapman, J., Lim, R. P., & Gehrke, P. C. (2007). The effects of three organic chemicals on the upper thermal tolerances of four freshwater fishes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(7), 1454-1459.

- Polat, H., Erkoc, F. Ü., Viran, R., & Kocak, O. (2002). Investigation of acute toxicity of beta-cypermethrin on guppies *Poecilia reticulata*. *Chemosphere*, 49, 39-44.
- R Development Core Team. (2016). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Reynolds, W. W., & Casterlin, M. E. (1979). Behavioral thermoregulation and the "final preferendum" paradigm. *American zoologist*(19), 211-224.
- Rosen, D. E., & Bailey, R. M. (1963). The pociliid fishes (Cyprinodontiformes): their structure, zoogeography, and systematics. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 126, 1-176.
- Sajiki, J., & Yonekubo, J. (2003). Leaching of bisphenol A (BPA) to seawater from polycarbonate and its degradation by reactive oxygen species. *Chemosphere*, 51, 55-62.
- Schultz, N., Norrgren, L., Grawe, J., Johannsson, A., & Medhage, Ö. (1993). Micronuclei frequency in circulating erythrocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) subjected to radiation, an image analysis and flow cytometric study. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 105C(2), 207-211.
- Segner, H. (2007). Ecotoxicology - How to assess the impact of toxicants in a multifactorial environmet? En C. Mothersill, I. Mosse, & C. Seymour (Edits.), *Multiple stressors: A challenge for the future* (Primera ed.). Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- SENASA - Servicio Nacional de Sanidad Agraria, Ministerio de Agricultura. (2013). Disponen la publicación del listado anual de plaguicidas registrados, cancelados y prohibidos. *Resolución Directoral 0020-2013-AG-SENASA-DIAIA*.

- Sharbidre, A. A., Metkari, V., & Patode, P. (2011). Effect of methyl paration and chlorpyrifos on certain biomarker in various tissues of guppy fish, *Poecilia reticulata*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 101, 132-141.
- Snieszko, S. F. (1974). The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *Journal of Fish Biology*, 6(2), 197-208.
- Somero, G. (1995). Proteins and temperature. *Annual Review Physiology*(57), 43-78.
- Sotil, G., Tarazona, J., Alvis, R., Francia, J., & Shiga, B. (2008). Comparative evaluation of the DNA damage response in two Peruvian marine bivalves exposed to changes in temperature. *Helgoland Marine Research*, 61(1), 101.
- Sunday, J. M., Bates, A. E., & Dulvy, N. K. (2011). Global analysis of thermal tolerance and latitude in ectotherms. *Proceedings of the Royal Society B*, 278, 1823-1830.
- USEPA - United States Environmental Protection Agency . (1994). Using toxicity tests in ecological risk assessment. *Intermittent Bulletin*, 2(1).
- USEPA - United States Environmental Protection Agency. (2002-a). *Interim reregistration eligibility decision for Chlorpyrifos*.
- USEPA - United States Environmental Protection Agency. (2002-b). *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms* (Quinta ed.).
- Van der Laan, R., Eschemeyer, W., & Fricke, R. (2014). Family-group names of Recent fishes. *Zotaxa*, 3882, 74-76.
- van Straalen , N. M. (2003). Ecotoxicology becomes stress ecology. *Environmental science & technology*, 37(17), 324A-330A.

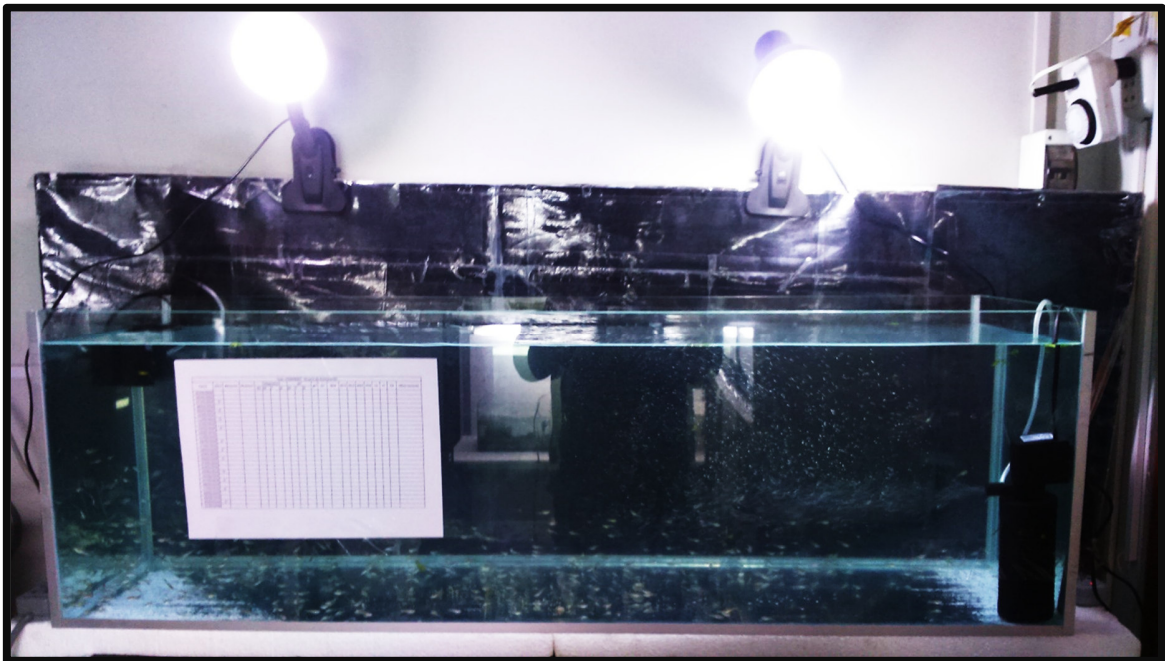
- Vasseur, P. (1995). Indices for carcinogenicity in aquatic ecosystems: Significance and development. En D. J. Rapport, C. L. Gaudet, & P. Calow (Edits.), *Evaluating and monitoring the health of large-scale ecosystems* (Primera ed.). Quebec, Canada: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Vasseur, P., Atienzar, F., Cossu-Leguille, C., Rodius, F., & Lemièrre, S. (2013). Biomarkers of genotoxicity for In Situ studies at individual and population levels. En C. Amiard-Triquet, J.-C. Amiard, & P. S. Rainbow (Edits.), *Ecological Biomarkers* (págs. 327-360). Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC.
- Viran, R., Erkoc, F. Ü., Polat, H., & Kocak, O. (2003). Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55, 82-85.
- Walker, C. H., Sibly, R. M., Hopkin, S. P., & Peakall, D. B. (2012). *Principios de ecotoxicología* (Cuarta ed.). CRC Press.
- Wester, P. W., & Canton, H. H. (1992). Histopathological effects in *Poecilia reticulata* (Guppy) exposed to Methyl mercury chloride. *Toxicologic pathology*, 20(1), 81-92.
- Xing, H., Li, S., Wang, Z., Gao, X., Xu, S., & Wang, X. (2012). Histopathological changes and antioxidant response in brain and kidney of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. *Chemosphere*(88), 377-383.
- Yilmaz, M., Gül, A., & Erbash, K. (2004). Acute toxicity of alpha-cypermethrin to guppy (*Poecilia reticulata*, Pallas, 1859). *Chemosphere*, 56, 381-285.
- Zhou, G. J., Wang, Z., Lau, E., Xu, X., & Leung, K. (2014). Can we predict temperature-dependent chemical toxicity to marine organisms and set appropriate water quality guidelines for protecting marine ecosystems under different thermal scenarios? *Marine pollution bulletin*, 87(1), 11-21.

Anexos

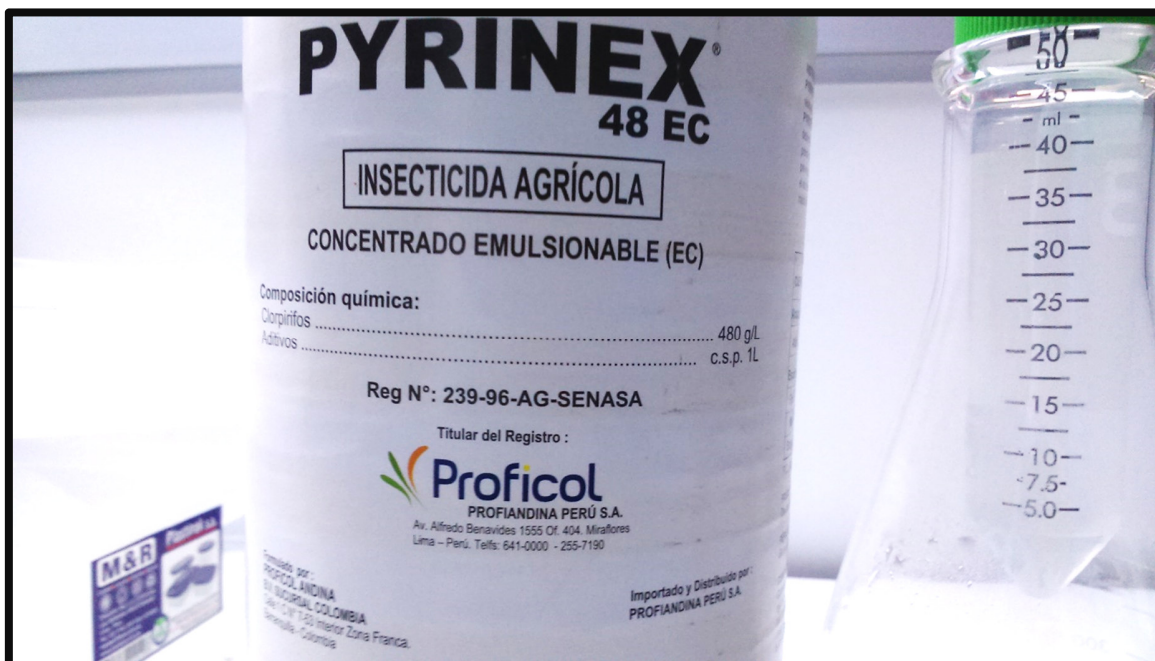
Anexo 1 Registro Fotográfico



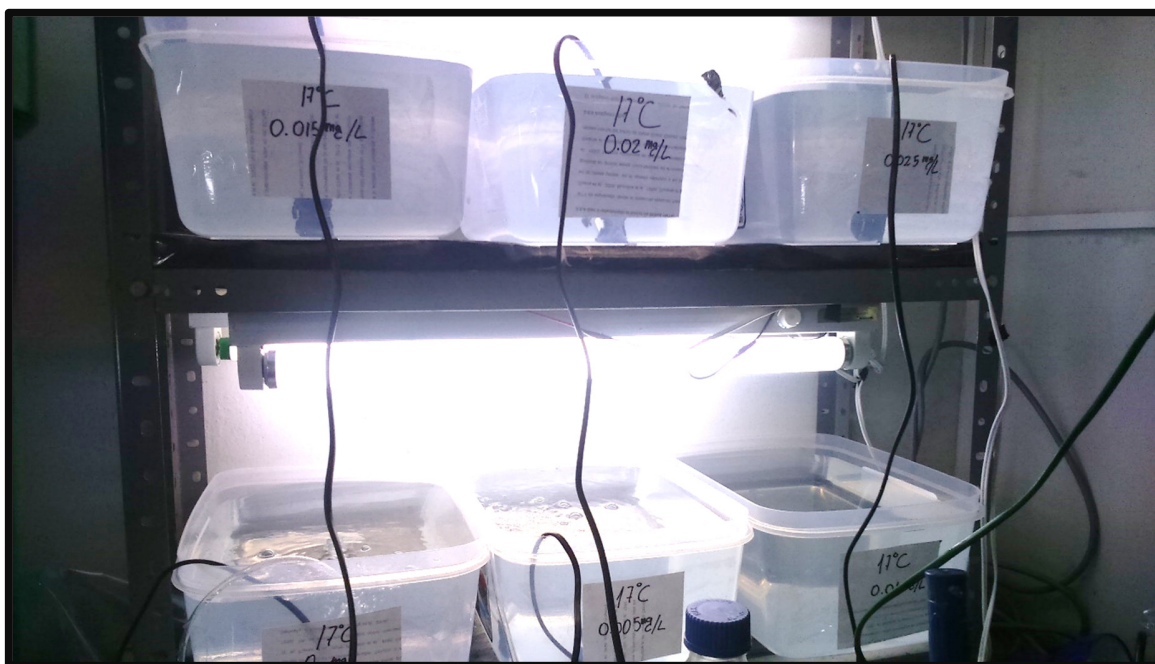
Fotografía 2: Lugar de colecta Centro de Investigación Acuícola de Calango (UCSUR)



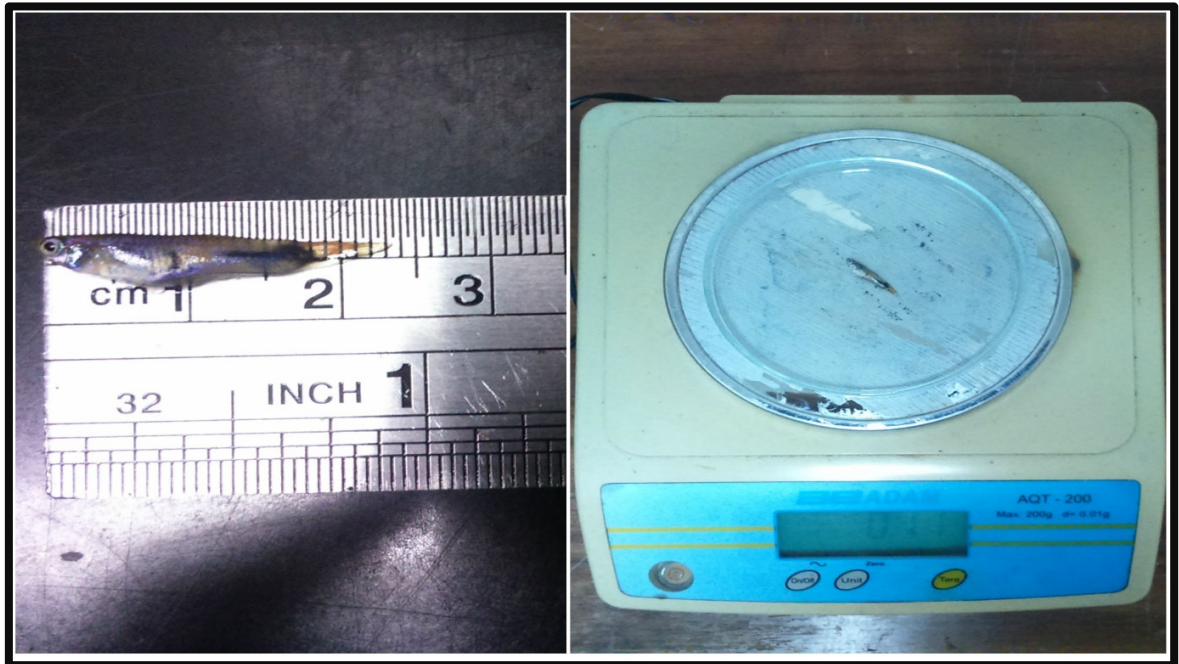
Fotografía 3: Acuario de cuarentena y aclimatación de *P. reticulata*



Fotografía 4: Stock de Pyrinex ® de 480 g/L de ingrediente activo Clorpirifos



Fotografía 5: Acuarios de tratamientos de Clorpirifos x Temperatura



Fotografía 6: Individuos machos de *P. reticulata* medidos y pesados

Anexo 2 Figuras

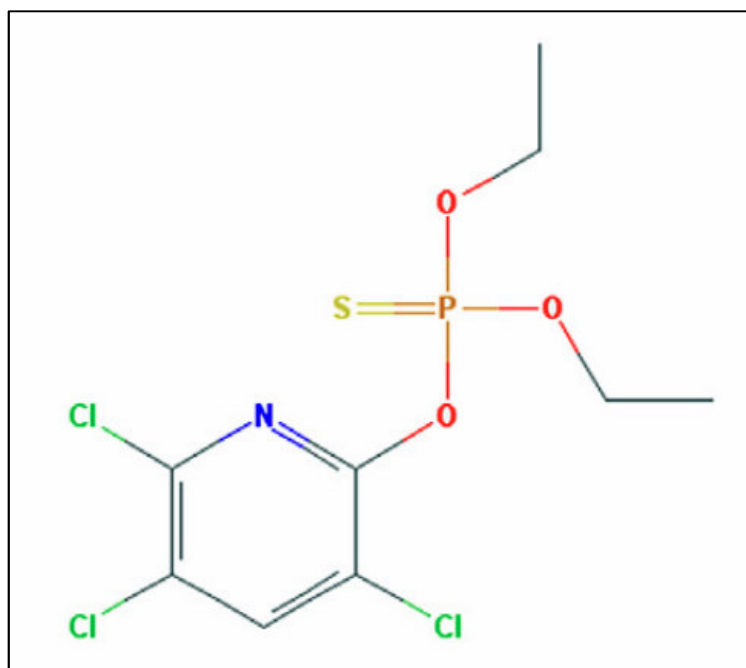


Figura 9: Estructura química 2D del Clorpirifos

Fuente: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/structurefly.cgi?cid=2730&width=400&height=400>

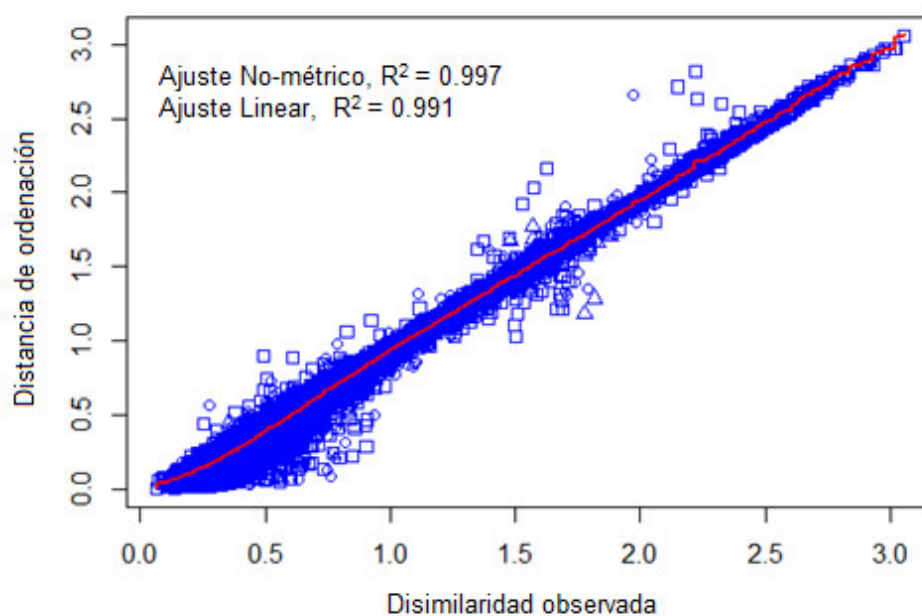


Figura 10: Diagrama de Shepard de residuos reales vs. ajustados del diagrama NDMS

Anexo 3 Tablas

Concentración (mg/L)	Volumen de solución stock de Clorpirifos para 10 L de solución
0 (Control)	0 µL
0.005	5 µL
0.010	10 µL
0.015	15 µL
0.020	20 µL
0.025	25 µL

Tabla 3: Volumen de solución de stock de Clorpirifos por tratamiento

Variable	T (°C)	N	Promedio	Desviación Estándar	Mínimo	Primer cuartil	Mediana	Tercer cuartil	Máximo
Longitud Total (cm)	17	60	2.19	0.12	2.00	2.10	2.20	2.30	2.50
	25	60	2.23	0.12	1.90	2.13	2.20	2.30	2.50
	30	60	2.21	0.12	2.00	2.10	2.20	2.30	2.50
	Total	180	2.21	0.01	1.90	1.90	2.10	2.20	2.50
Longitud Estándar (cm)	17	60	1.73	0.11	1.50	1.70	1.70	1.80	2.00
	25	60	1.72	0.10	1.40	1.60	1.70	1.80	2.00
	30	60	1.70	0.09	1.60	1.60	1.70	1.80	2.00
	Total	180	1.72	0.09	1.40	1.40	1.60	1.70	2.00
Peso (g)	17	60	0.10	0.01	0.08	0.09	0.09	0.10	0.12
	25	60	0.10	0.01	0.08	0.09	0.10	0.11	0.13
	30	60	0.10	0.01	0.09	0.09	0.10	0.11	0.13
	Total	180	0.10	0.01	0.08	0.08	0.09	0.10	0.13

Tabla 4: Estadísticos descriptivos para individuos de *Poecilia reticulata*

Temperatura de ensayo	Estadístico de K2	Grados de libertad	Valor de p ($\alpha = 0.05$)
17°C	6.30	5	0.28
25°C	7.59	5	0.18
30°C	13.74	5	0.02*

Tabla 5: Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett – Temperatura de ensayo

Temperatura de ensayo	Estadístico de K2	Valor de p ($\alpha = 0.05$)
17°C	0.94	1.03E-06
25°C	0.92	1.75E-08
30°C	0.93	1.27E-07

Tabla 6: Prueba de normalidad de Shapiro – Wilk – Temperatura de ensayo

Temperatura de ensayo	Chi - cuadrado	Grados de libertad	Valor de p ($\alpha = 0.05$)
17°C	9.58	5	0.09
25°C	8.54	5	0.13
30°C	7.74	5	0.19

Tabla 7: Prueba de Kruskal – Wallis – Temperatura de ensayo

Límites de toxicidad según:		Alabaster 1982						Alabaster 1982	Lewis & Morris 1986					Alabaster 1982			
Temperatura de aclimatación	Fecha	6.0 - 9.0						0.025	0.24					0.025			0.01
		Fisicoquímicos															
		pH	Conductividad (mS/cm)	Alcalinidad dKH	NH ₄ mg/l	NH ₃ mg/l	NO ₂ mg/l	NO ₃ mg/l	PO ₄ mg/l	Fe mg/l	Cl mg/l						
Límite de detección		----	----	1	0.5	0.003	0.1	1	0.5	0.1	0.02						
17	05/05/2016	7.98	0.92	6	0.5	0.009	<0.1	50	0.5	<0.1	<0.02						
17	07/05/2016	7.86	0.94	8	1	0.009	<0.1	50	0.5	<0.1	<0.02						
17	10/05/2016	7.66	0.92	6	0.5	0.009	<0.1	50	0.5	<0.1	<0.02						
17	14/05/2016	7.88	0.92	6	0.5	0.009	<0.1	50	0.5	<0.1	<0.02						
17	17/05/2016	7.74	0.93	6	0.5	0.009	<0.1	50	0.5	<0.1	<0.02						
17	21/05/2016	7.74	0.93	7	0.5	0.009	<0.1	50	0.5	<0.1	<0.02						
17	24/05/2016	7.86	0.93	6	0.5	0.009	<0.1	50	0.5	<0.1	<0.02						
17	28/05/2016	7.71	0.94	6	0.5	0.009	<0.1	50	0.5	<0.1	<0.02						
17	31/05/2016	7.77	0.92	6	0.5	0.009	<0.1	50	0.5	<0.1	<0.02						
25	04/06/2016	7.90	0.94	6	0.5	0.009	<0.1	50	0.5	<0.1	<0.02						
25	07/06/2016	7.81	0.93	6	0.5	0.009	<0.1	50	0.5	<0.1	<0.02						
25	11/06/2016	7.83	0.92	6	0.5	0.009	<0.1	50	0.5	<0.1	<0.02						
25	14/06/2016	7.65	0.91	6	0.5	0.009	<0.1	50	0.5	<0.1	<0.02						
25	18/06/2016	7.80	0.92	6	0.5	0.009	<0.1	50	0.5	<0.1	<0.02						
30	21/06/2016	7.81	0.92	7	0.5	0.009	<0.1	50	0.5	<0.1	<0.02						
30	25/06/2016	7.76	0.91	6	0.5	0.009	<0.1	50	0.5	<0.1	<0.02						
30	28/06/2016	7.75	0.91	6	0.5	0.009	<0.1	50	0.5	<0.1	<0.02						
30	02/07/2016	7.80	0.92	6	0.5	0.009	<0.1	50	0.5	<0.1	<0.02						
30	05/07/2016	7.84	0.93	6	0.5	0.009	<0.1	50	0.5	<0.1	<0.02						

Tabla 8: Registro de parámetros de calidad de agua del acuario de aclimatación

Límites de toxicidad en peces de agua dulce según:				Alabaster 1982	---	---	---	Alabaster 1982	Lewis & Morris 1986	---	---	---	Alabaster 1982
Tratamiento		Fase de tratamiento	Fecha	pH	Conductividad (mS/cm)	Alcalinidad dKH	NH ₄ mg/l	NH ₃ mg/l	NO ₂ mg/l	NO ₃ mg/l	PO ₄ mg/l	Fe mg/l	Alabaster 1982
Temperatura	CP mg/l/l	Físicoquímicos											
Límite de Detección				---	---	1	0.5	<0.003	0.1	1	0.5	0.1	0.01
17	0	Inicio	29/05/2016	7.81	0.46	5	<0.5	<0.003	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
17	0	Fin	05/06/2016	7.92	0.47	5	0.5	0.009	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
17	0.005	Inicio	29/05/2016	7.79	0.46	5	<0.5	<0.003	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
17	0.005	Fin	05/06/2016	7.83	0.46	5	0.5	0.009	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
17	0.010	Inicio	29/05/2016	7.8	0.465	5	<0.5	<0.003	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
17	0.010	Fin	05/06/2016	7.85	0.465	5	0.5	0.009	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
17	0.015	Inicio	29/05/2016	7.81	0.465	5	<0.5	<0.003	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
17	0.015	Fin	05/06/2016	7.84	0.47	5	0.5	0.009	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
17	0.020	Inicio	29/05/2016	7.8	0.46	5	<0.5	<0.003	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
17	0.020	Fin	05/06/2016	7.86	0.47	5	0.5	0.009	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
17	0.025	Inicio	29/05/2016	7.76	0.465	5	<0.5	<0.003	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
17	0.025	Fin	05/06/2016	7.8	0.46	5	0.5	0.009	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
25	0	Inicio	18/06/2016	7.81	0.455	5	<0.5	<0.003	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
25	0	Fin	24/06/2016	7.85	0.46	5	0.5	0.009	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
25	0.005	Inicio	18/06/2016	7.8	0.46	5	<0.5	<0.003	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
25	0.005	Fin	24/06/2016	7.82	0.455	5	0.5	0.009	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
25	0.010	Inicio	18/06/2016	7.78	0.465	5	<0.5	<0.003	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
25	0.010	Fin	24/06/2016	7.81	0.47	5	0.5	0.009	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
25	0.015	Inicio	18/06/2016	7.8	0.46	5	<0.5	<0.003	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
25	0.015	Fin	24/06/2016	7.8	0.47	5	0.5	0.009	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
25	0.020	Inicio	18/06/2016	7.94	0.46	5	<0.5	<0.003	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
25	0.020	Fin	24/06/2016	7.99	0.455	5	0.5	0.009	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
25	0.025	Inicio	18/06/2016	7.97	0.46	5	<0.5	<0.003	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
25	0.025	Fin	24/06/2016	7.99	0.47	5	0.5	0.009	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
30	0	Inicio	02/07/2016	7.81	0.47	5	<0.5	<0.003	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
30	0	Fin	08/07/2016	7.92	0.48	5	0.5	0.009	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
30	0.005	Inicio	02/07/2016	7.79	0.46	5	<0.5	<0.003	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
30	0.005	Fin	08/07/2016	7.83	0.47	5	0.5	0.009	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
30	0.010	Inicio	02/07/2016	7.8	0.46	5	<0.5	<0.003	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
30	0.010	Fin	08/07/2016	7.85	0.46	5	0.5	0.009	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
30	0.015	Inicio	02/07/2016	7.81	0.45	5	<0.5	<0.003	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
30	0.015	Fin	08/07/2016	7.84	0.46	5	0.5	0.009	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
30	0.020	Inicio	02/07/2016	7.79	0.46	5	<0.5	<0.003	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
30	0.020	Fin	08/07/2016	7.81	0.45	5	0.5	0.009	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
30	0.025	Inicio	02/07/2016	7.8	0.46	5	<0.5	<0.003	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02
30	0.025	Fin	08/07/2016	7.8	0.46	5	0.5	0.009	<0.1	<1	<0.5	<0.1	<0.02

Tabla 9: Registro de parámetros de calidad de agua de los acuarios de tratamientos

Concentración de Clorpirifos	Grupos	t	Valor de P	N° de permutaciones
control	17° - 25° C	0.50	0.948	993
	17° - 30° C	0.61	0.888	995
	25° - 30° C	0.54	0.928	992
0.005 mg/L	17° - 25° C	3.02	0.001	995
	17° - 30° C	4.27	0.001	992
	25° - 30° C	2.46	0.001	992
0.010 mg/L	17° - 25° C	2.70	0.001	995
	17° - 30° C	6.17	0.001	991
	25° - 30° C	3.89	0.001	995
0.015 mg/L	17° - 25° C	3.14	0.003	995
	17° - 30° C	6.67	0.001	992
	25° - 30° C	3.42	0.001	994
0.020 mg/L	17° - 25° C	7.16	0.001	996
	17° - 30° C	9.85	0.001	992
	25° - 30° C	2.54	0.002	996
0.025 mg/L	17° - 25° C	9.23	0.001	991
	17° - 30° C	10.23	0.001	992
	25° - 30° C	1.75	0.018	993

Tabla 10: Resultados del análisis de comparaciones por pares mediante PERMANOVA de Temperatura según la Concentración de Clorpirifos

Temperatura de ensayo	Grupos	t	Valor de P	N° de Permutaciones
17° C	control - 0.005 mg/L	1.41	0.079	996
	control - 0.010 mg/L	4.42	0.001	996
	control - 0.015 mg/L	7.79	0.001	990
	control - 0.020 mg/L	4.17	0.001	997
	control - 0.025 mg/L	4.64	0.001	991
	0.005 mg/L - 0.010 mg/L	3.67	0.001	991
	0.005 mg/L - 0.015 mg/L	7.61	0.001	992
	0.005 mg/L - 0.020 mg/L	3.71	0.001	995
	0.005 mg/L - 0.025 mg/L	3.99	0.001	994
	0.010 mg/L - 0.015 mg/L	3.87	0.001	995
	0.010 mg/L - 0.020 mg/L	1.63	0.046	994
	0.010 mg/L - 0.025 mg/L	0.98	0.466	991
	0.015 mg/L - 0.020 mg/L	3.45	0.001	995
	0.015 mg/L - 0.025 mg/L	2.70	0.001	992
	0.020 mg/L - 0.025 mg/L	1.10	0.301	993
25° C	control - 0.005 mg/L	4.11	0.001	988
	control - 0.010 mg/L	7.23	0.001	993
	control - 0.015 mg/L	10.78	0.001	998
	control - 0.020 mg/L	12.24	0.001	988
	control - 0.025 mg/L	16.17	0.001	996
	0.005 mg/L - 0.010 mg/L	4.29	0.001	994
	0.005 mg/L - 0.015 mg/L	8.41	0.001	995
	0.005 mg/L - 0.020 mg/L	10.06	0.001	994
	0.005 mg/L - 0.025 mg/L	14.81	0.001	993
	0.010 mg/L - 0.015 mg/L	3.61	0.001	994
	0.010 mg/L - 0.020 mg/L	5.05	0.001	989
	0.010 mg/L - 0.025 mg/L	8.50	0.001	997
	0.015 mg/L - 0.020 mg/L	2.19	0.018	996
	0.015 mg/L - 0.025 mg/L	5.33	0.001	991
	0.020 mg/L - 0.025 mg/L	3.07	0.002	986
30°C	control - 0.005 mg/L	5.15	0.001	994
	control - 0.010 mg/L	10.93	0.001	990
	control - 0.015 mg/L	14.31	0.001	994
	control - 0.020 mg/L	15.55	0.001	992
	control - 0.025 mg/L	17.37	0.001	986
	0.005 mg/L - 0.010 mg/L	5.62	0.001	994
	0.005 mg/L - 0.015 mg/L	8.44	0.001	993
	0.005 mg/L - 0.020 mg/L	9.76	0.001	992
	0.005 mg/L - 0.025 mg/L	11.45	0.001	997
	0.010 mg/L - 0.015 mg/L	2.59	0.002	995
	0.010 mg/L - 0.020 mg/L	4.08	0.001	997
	0.010 mg/L - 0.025 mg/L	5.84	0.001	991
	0.015 mg/L - 0.020 mg/L	1.98	0.008	994
	0.015 mg/L - 0.025 mg/L	4.34	0.001	993
	0.020 mg/L - 0.025 mg/L	2.38	0.001	994

Tabla 11: Resultados del análisis de comparaciones por pares mediante PERMANOVA de Concentración de Clorpirifos según la Temperatura